

Aus dem Labor für Tumorimmunologie
LIFE-Zentrum
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschäftsführer: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Zimmermann

**Funktionelle Analyse von CEACAM20, einem epithelialen Rezeptor mit
antiadhäsiven Eigenschaften**

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Carina Welte
geb. Hoffmann

aus Günzburg

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Zimmermann
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Stefan Böck Prof. Dr. Andreas Jung
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	19.12.2013

für Benjamin

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Rolle der Adhäsion bei Entstehung epithelialer Tumore	1
1.2	Bedeutung der Tumormarker	1
1.2.1	Das Magenkarzinom	3
1.3	Die CEA-Familie	3
1.3.1	Die CEACAMs des Menschen	4
1.3.1.1	Funktion und Funktionsorte der CEACAMs	6
1.3.2	PSG-Subgruppe	9
1.4	ITAM-vermittelte Signaltransduktion	10
1.5	Aktueller Wissensstand zu CEACAM20	12
1.6	Zielsetzung der Dissertation	14
2	MATERIALIEN	15
2.1	Chemikalien und Reagenzien	15
2.2	Enzyme und Kits	16
2.3	Verbrauchsmaterialien	17
2.4	Geräte	17
2.5	Antikörper	18
2.6	Oligonukleotide	19
2.7	Bakterien	19
2.8	Zelllinien	19
2.9	Gewebe	19
2.10	RNA	20
2.11	Verwendete Vektoren	20
2.12	Software und Internetadressen	20

3	METHODEN	21
3.1	Molekularbiologische Methoden	21
3.1.1	DNA-Agarosegelelektrophorese	21
3.1.2	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	21
3.1.3	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	22
3.1.4	Dephosphorylierung von DNA	23
3.1.5	Aufreinigung von DNA	23
3.1.6	Ligation	23
3.1.7	Transformation kompetenter Bakterien	24
3.1.8	Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion	24
3.1.9	Plasmidpräparation	25
3.1.10	Herstellung von <i>E.-coli</i> -Dauerkulturen	26
3.1.11	Konzentrationsbestimmung und Reinheit der DNA	26
3.1.12	DNA-Sequenzierung	26
3.1.13	Generierung von glatten DNA-Enden mittels Klenow-Polymerase	27
3.1.14	Induzierbare Expression mit dem Tet-on-Expressionsvektor pRTS	27
3.1.14.1	Klonierung der CEACAM20-cDNA in pRTS	28
3.1.15	Gezieltes Einführen von Mutationen mittels PCR	30
3.1.16	RNA-Isolierung und Qualitätsmessung	32
3.1.17	Reverse Transkription von RNA	33
3.1.18	<i>Real-time</i> -Polymersase-Kettenreaktion (RT-PCR)	34
3.2	Zellbiologische Methoden	34
3.2.1	Kultivierung von Zellen	34
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl	35
3.2.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen	35
3.2.4	Transiente Transfektion von Kulturzellen	36
3.2.5	Stabile Transfektion von Kulturzellen	36
3.2.6	Pervanadat-Behandlung von Kulturzellen	37
3.2.7	Lyse der Zellen	37
3.2.8	Proteinbestimmung	38
3.2.9	Erstellung einer Wachstumskurve von stabil transfizierten Kulturzellen	38
3.2.10	Zell-Vitalitätsassay	38
3.2.11	Herstellung von Zytospins	39
3.3	Immunologische Methoden	40
3.3.1	Immunhistologie	40
3.3.2	Zellbasierter ELISA (CELISA)	41
3.3.3	Durchflusszytometrie	42
3.3.4	Immunpräzipitation	43
3.3.5	Auftrennung von Proteinproben im Gradientengel	44
3.3.6	Proteinanalyse im <i>Western blot</i>	44
3.3.7	Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie	45

4	ERGEBNISSE	48
4.1	Expressionsorte von CEACAM20	48
4.1.1	Expression von CEACAM20 in normalem Magengewebe, Magenkarzinomen und Magenkarzinomzelllinien des Menschen	48
4.1.1.1	Quantitativer Nachweis von CEACAM20-mRNA in Magenkarzinomgewebe und zugehörigen Normalmagengewebe mittels <i>real-time</i> -PCR	48
4.1.2	Untersuchung des Expressionsmusters von CEACAM20 in Magenkarzinom- und normalem Magengewebe auf Proteinebene	50
4.1.2.1	Untersuchung der Antikörperspezifität	50
4.1.2.2	CEACAM20-Proteinnachweis in Magenkarzinomgewebe	52
4.1.2.3	Expression von CEACAM20 im Ovar	53
4.2	Funktionsanalysen von CEACAM20	56
4.2.1	Herstellung und Charakterisierung von stabilen induzierbaren CEACAM20-exprimierenden Transfektanten	56
4.2.1.1	Klonierung der CEACAM20-cDNA in pRTS	56
4.2.1.2	Screening der Zellklone auf Induzierbarkeit und CEACAM20-Expression mittels CELISA	56
4.2.2	Charakterisierung ausgewählter stabil transfizierter Zell-klone auf Induzierbarkeit und CEACAM20-Expression	57
4.2.2.1	Durchflusszytometrie (FACS)	57
4.2.2.2	Western blot	58
4.2.2.3	CEACAM20 beeinträchtigt die Vitalität von HEK293T-Zellen	60
4.2.2.4	Hemmung der Zellvitalität und Zellproliferation wird nicht durch die zytoplasmatische Domäne vermittelt	61
4.2.2.5	Herstellung von zytoplasmatischen Mutanten	61
4.2.2.6	Einfluss von CEACAM20-Mutanten auf die Zellvitalität	63
4.2.2.7	Einfluss von CEACAM20 auf die Zellproliferation	65
4.2.2.8	Verlust von Adhäsion durch CEACAM20-Expression	66
4.2.3	Ist die ITAM-Konsensussequenz von CEACAM20 funktionell?	68
4.2.3.1	Können die zytoplasmatischen Tyrosine in CEACAM20 phosphoryliert werden?	68
4.2.3.2	Quantifizierung von SYK-mRNA in humanen Magenzelllinien mittels <i>real-time</i> -PCR	70
4.2.3.3	Identifizierung möglicher Bindepartner des zytoplasmatischen Bereichs von CEACAM20 durch die Massenspektrometrie	70
5	DISKUSSION	73
5.1	Überexpression von CEACAM20 führt in vitro zu Adhärenzverlust	73
5.2	Hemmung der Zell-Zell-Interaktion durch CEACAM20	74
5.3	Funktionalität des ITAM-Motivs	75

5.4	Mögliche ITAM-Funktion	76
5.5	Identifizierung möglicher <i>Downstream</i> -Partner von CEACAM20	77
5.6	Prolin-reiche Motive in der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM20 können an der Regulation der Zelladhäsion beteiligt sein	79
5.7	Ist CEACAM 3 mit seinem ITAM oder CEACAM1 mit seinem inhibitorischen ITIM-Motiv ein Kooperationspartner von CEACAM20?	81
5.8	Expression und Funktion von CEACAM20 in humanem Gewebe	82
6	ZUSAMMENFASSUNG	85
7	LITERATURVERZEICHNIS	86
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	102
9	DANKSAGUNG	104

1 Einleitung

1.1 Rolle der Adhäsion bei Entstehung epithelialer Tumore

Epithelien müssen sich zur Erhaltung ihrer vielfältigen Funktionen in regelmäßigen Abständen erneuern. Durch Genexpression wird der programmierte Zelltod (Apoptose) ausgelöst. Die Zelle verliert ohne eine Entzündungsreaktion hervorzurufen ihre Adhäsion und löst sich aus ihrem Verband. Veränderung in der Erneuerung von Epithelien können zu benignen, aber auch malignen Tumoren führen (Eastwood, 1995). Andererseits wird auch in vitalen Zellen, welche sich aus dem Zell-Matrix-Verband gelöst haben Anoikis (Sonderform der Apoptose) initiiert (Frisch et al., 1996). Tumorzellen haben jedoch Mechanismen entwickelt, um der Anoikis zu widerstehen. Die Zellen überleben trotz Adhäsionsverlust und können in Lymphknoten oder anderen Organen nach Re-Adhäsion metastasieren (Simpson et al., 2008). Entwickelt sich ein maligner Tumor aus einem drüsenbildenden Epithel, so wird er als Adenokarzinom (*Carcinoma adenomatosum*) bezeichnet. Betroffen sein können eine Vielzahl unterschiedlicher Organe wie der gastrointestinale Trakt, beispielsweise Magen (siehe Kapitel 1.1.2), sowie Lunge, Pankreas, Brustdrüse und die geschlechtsspezifischen Organe Ovar und Prostata.

Aus Haut- oder Schleimhautepithel können sich Plattenepithelkarzinome entwickeln. Bei ihrer Genese spielen chronische Entzündungen, als auch wiederkehrende strahlungsbedingte Schädigungen des Epithels eine bedeutende Rolle (Gasche et al., 2011; Goldberg et al., 2010).

1.2 Bedeutung der Tumormarker

Somit ist eine Vielzahl der Tumore epithelialen Ursprungs und die Erforschung ihrer Entstehung und Progression wird immer wichtiger, denn Krebs stellt mit 25,3% aller Todesursachen, nach Herz- und Kreislauferkrankungen, die zweithäufigste Todesursache dar (Statistisches Bundesamt, 2009). Die folgende Grafik zeigt wie sich verschiedene Tumorlokalisationen auf die Sterblichkeit auswirken. Man erkennt, dass es eine Reihe geschlechtsspezifischer Unterschiede gibt (Abbildung 1).

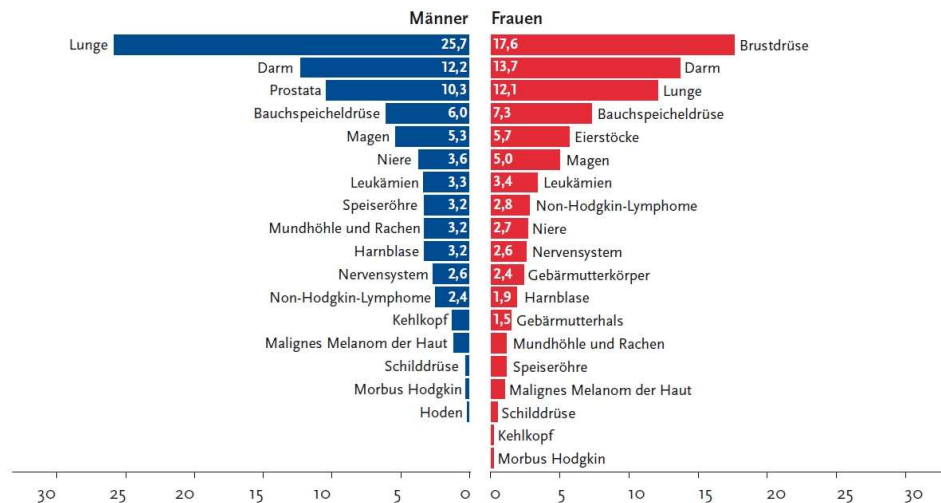


Abbildung 1: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2006. Quelle: Amtliche Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.

Damit die tumorbedingte Sterblichkeit langfristig und anhaltend gesenkt werden kann, ist die Erforschung von Tumormarkern zur Tumorfrüherkennung und dessen Nachsorge enorm wichtig. Einige Tumormarker haben bereits im klinischen Alltag ihren Stellenwert im Tumormanagement gefunden. Hier sind beispielsweise das prostataspezifische Antigen (PSA) zur Früherkennung von Prostatakarzinomen, als auch das karzinoembryonale Antigen (CEA) zu nennen (siehe Kapitel 1.2.2). Letzteres wurde zur Erkennung von Adenokarzinomrezidiven und Metastasen des Dickdarms (Wanebo et al., 1989), der Lunge (Castaldo et al., 1997) und diverser anderer Tumore etabliert.

Zudem werden prognostische Marker in der Therapieentscheidung berücksichtigt und sind ein wichtiger Bestandteil der individuellen Risikostratifizierung eines Patienten. Folglich helfen sie dem Individuum eine möglichst erfolgsversprechende Therapie zu erhalten und gleichzeitig unnötige Nebenwirkungen zu vermeiden. Prädiktive Marker verhindern die Durchführung unwirksamer Therapien. Beispielsweise schließt sich beim Kolonkarzinom eine Anti-EGFR-Therapie mit Cetuximab aus, wenn eine aktivierende K-ras-Mutation im Tumor des Patienten nachgewiesen wird. K-ras liegt nämlich downstream von EGFR-*Signaling*, so dass die EGFR-Inhibition unwirksam ist (Alberts et al., 2012). Somit kann durch den Einsatz von Markern eine Kostenoptimierung bewerkstelligt werden und man ist dem gewünschten Ziel eines individuellen, auf den Patienten zugeschnittenen Therapiekonzepts einen Schritt näher gekommen.

1.2.1 Das Magenkarzinom

Das Magenkarzinom zählt zu den fünfthäufigsten krebsbedingten Todesursachen bei Männern und zu den sechsthäufigsten bei Frauen (Abbildung 1). Als Risikofaktoren zählen genetische Faktoren und Alter, aber auch bestimmte Erkrankungen wie die *Helicobacter pylori* assoziierte Typ-B-Gastritis, die chronisch atrophische Autoimmungastritis und die Ménétrier-Riesenfaltengastritis. Zudem hat die Ernährung einen Einfluss: ein hoher Nitratgehalt der Nahrung gilt als Risikofaktor, während eine ausgewogene Ernährung mit reichlich Obst und Gemüse sich protektiv auswirken soll (Compare et al., 2010). Symptome werden meist erst in fortgeschrittenen Stadien präsent. Eventuell tritt eine unspezifische Symptomatik wie Gewichtsverlust, subfebrile Temperaturen und Leistungsminderung auf. Zudem können Druckgefühl im Oberbauch, Brechreiz und Widerwille gegen Fleisch bestehen. Diagnose und *Grading* werden durch die Gastroskopie mittels Biopsien gesichert. Im Rahmen des *Stagings* erfolgt zur Beurteilung der Tiefenausdehnung und benachbarten Lymphknoten eine Endosonographie. Die Fernmetastasierung wird mit Hilfe einer abdominalen Computertomographie (CT) und Röntgenaufnahme des Thorax evaluiert. Tumormarker dienen im klinischen Alltag ausschließlich zur postoperativen Nachkontrolle. Hierbei findet vor allem CA 72-4 Verwendung, weniger sensitive Marker sind CEA und CA 19-9. Die Laurén-Klassifikation bestimmt Art und Ausmaß des Resektionsverfahrens. Sie unterscheidet zwischen intestinalem Typ und diffusem Typ. Der intestinale Typ ist polypös wachsend und gut begrenzt, während der diffuse Typ infiltrativ wächst und folglich schlecht begrenzt ist. 95% der Magenkarzinome sind Adenokarzinom (Dicken et al., 2005; Herold et al., 2010).

1.3 Die CEA-Familie

Charakteristisch ist die Vielfalt ihrer Mitglieder und die starken Unterschiede in Bezug auf Anzahl und Konservierung zwischen den verschiedenen Säugerordnungen. Es handelt sich somit um eine sehr rasch entwickelte Genfamilie (Thompson und Zimmermann, 1988; Rudert et al., 1989; Kammerer und Zimmermann, 2010). Auffallend ist, dass von den 31 Mitgliedern der CEA-Familie der Maus nur fünf ortholog zum Menschen sind, nämlich CEACAM1, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19 und CEACAM20 (Zebhauser et al., 2005). Interessanterweise sind die 4 letztgenannten Mitglieder am stärksten konserviert. Diese sind jedoch nur in

Säugetieren und nicht in anderen Wirbeltieren zu finden. Das Vorkommen von CEACAM18, CEACAM19 und CEACAM20 beschränkt sich dabei auf Säugetiere mit Plazenta und Beuteltiere, während CEACAM16 auch in eierlegenden Säugetieren, wie dem Schnabeltier, nachgewiesen wurde (Kammerer und Zimmermann, 2010).

Bei Betrachtung der Sequenz und Struktur stellt die CEA-Familie eine der unterschiedlichsten Gruppen von Glykoproteinen in Säugetieren dar. Kodiert wird die humane CEA-Familie durch 29 Gene, welche sich in zwei Abschnitten des langen Arms des Chromosoms 19 innerhalb eines 1,8 Mbp großen Bereichs befinden. Die CEA-Familie gehört der Immunglobulin-Superfamilie an. Ihre Mitglieder werden aufgrund der für eine Reihe von Familienmitgliedern nachgewiesene Zelladhäsionsfunktion auch CEA-verwandte Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (*CEA-related cell-cell adhesion molecules*; CEACAMs) genannt. Die schwangerschaftsspezifischen Glykoproteine (*pregnancy-specific glycoproteins*; PSGs) stellen eine Untergruppe von sezernierten Proteinen dar. Des Weiteren gibt es im Menschen, aber auch in anderen Spezies, viele Pseudogene (Zimmermann et al., 1988; Olsen et al., 1994; Beauchemin et al., 1999; Kammerer und Zimmermann, 2010).

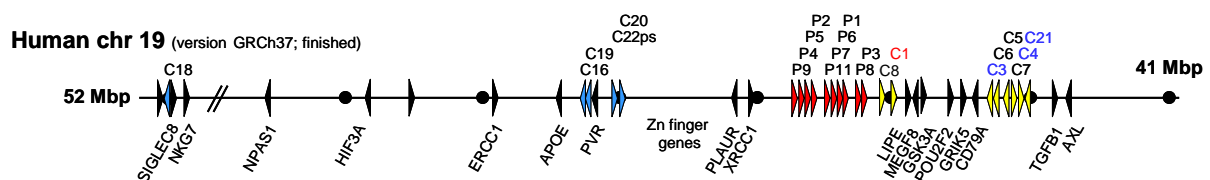


Abbildung 2: Genlokus und Anordnung der humanen Mitglieder der CEA-Genfamilie auf Chromosom 19 des Menschen. Die Lage der einzelnen Gene ist durch unterschiedlich gefärbte Dreiecke symbolisiert. Die rote Farbe repräsentiert die PSG-Subgruppe, die gelbe Farbe die CEACAM1-verwandten, die blaue Farbe die orthologen Mitglieder (mit Ausnahme von CEACAM1) der CEACAM-Subgruppe. Die Richtung der Dreieckspitze zeigt die Transkriptionsrichtung an. Zur Orientierung dienen die schwarz gefärbten Markergene. Rote bzw. blaue Gensymbole zeigen die Anwesenheit von ITIM bzw. ITAM-Motiv-kodierender Exone an. CC, CEACAM (Kammerer und Zimmermann, 2010).

1.3.1 Die CEACAMs des Menschen

Lässt man die PSGs außer Acht, enthalten die CEACAMs zwischen null und sechs IgC (*immunoglobulin constant*)-ähnliche Proteindomänen, die sich unterschiedlich kombinieren können. Hierbei werden Typ A und Typ B mit 85-93 Aminosäuren unterschieden. Weiterhin besitzen die Mitglieder eine IgV (*Ig variable*)-ähnliche Domäne, welcher die Faltblattstruktur-stabilisierende Disulfidbrücke fehlt. Diese

wurde durch eine Salzbrücke, gebildet von zwei gegensätzlich geladenen Aminosäuren, ersetzt (Williams und Barclay, 1988; Boehm et al., 1996; Hammarström, 1999).

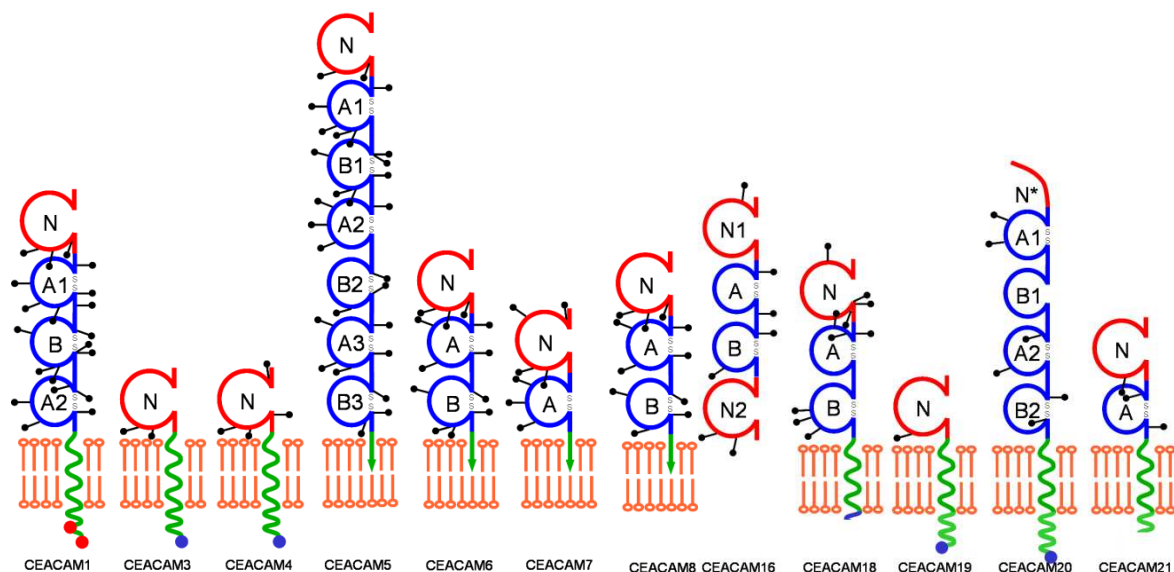


Abbildung 3: Struktureller Aufbau der humanen CEACAMs. Die Mitglieder werden mittels Transmembrandomäne (grüne geschwängelte Linie) oder GPI-Anker (grüner Pfeil) in der Doppelpolipidschicht verankert. Die einzige Ausnahme bildet das CEACAM16, welches sezerniert wird. Blaue Punkte innerhalb der zyttoplasmatischen Domäne symbolisieren funktionelle bzw. vermutete ITAMs im intrazellulären Bereich. ITIMs sind als rote Punkte zu erkennen. Die roten kreisähnlichen Strukturen stehen für IgV-ähnliche Domänen (N), die blauen für die IgC-ähnlichen Domänen (A, B). Innerhalb letzterer finden sich hochkonservierte Disulfidbrücken, welche zwischen jeweils zwei hochkonservierten Cysteinen gebildet werden. Konsensussequenzen für mögliche N-Glykosylierung werden durch gestielte Punkte repräsentiert. (<http://cea.klinikum.uni-muenchen.de/>).

Auffallend ist auch, dass die Moleküle häufig an Asparagin-Resten mit komplexen Kohlehydrat-Ketten glykolisiert sind (Yamashita et al., 1987) (Abbildung 3).

Sie zeigen ein heterogenes Expressionsmuster auf. Jedoch kommen sie bevorzugt auf hämatopoetischen Zellen und im apikalen Bereich von Epithelzellen vor (Prall et.al., 1996; Frängsmyr et al., 1999; Hammarström, 1999; Schölzel et al., 2000; Kuespert, 2006).

Bis auf CEACAM16, welches sezerniert wird, sind alle Mitglieder Membran verankert. Dies ist bei CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8 durch einen Glykosyphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) gewährleistet (Hefta et al, 1988; Hammarström, 1999). Dagegen sind CEACAM1, CEACAM3 und CEACAM4 über eine hydrophobe Transmembrandomäne fixiert. Die zyttoplasmatische Domäne wird entweder durch einen kurzen (zehn bis dreißig Aminosäuren) oder einem langen (73 Aminosäuren) bestehenden intrazellulären Bereich gebildet. In der langen Spleißvariante weist CEACAM1 zwei funktionelle *immunoreceptor tyrosine-based*

inhibition motifs (ITIM) auf, während CEACAM20 ein klassisches *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) und CEACAM3, CEACAM4 und CEACAM19 ein ITAM-ähnliches Motiv aufzeigen (Reth, 1989; Cambier, 1995; Zebhauser, 2005; Buntru et al., 2011).

Die meisten CEACAMs können, wie der Name schon hinweist, als Adhäsionsmoleküle Zell-Zellverbindungen vermitteln. Die Ausnahme bildet CEACAM3, CEACAM4 und CEACAM7 (Thompson et al., 1994; Kinugasa et al., 1998). Bereiche der N-Domäne sind dafür verantwortlich, dass CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM8 heterophil an andere CEA-Mitglieder oder homophil mit sich selbst binden können (Williams und Barclay, 1988; Mc Cuaig et al., 1992; Zhou et al., 1993; Öbrink, 1997; Hammarström, 1999; Stern et al., 2005).

1.3.1.1 Funktion und Funktionsorte der CEACAMs

Das CEACAM5, besser bekannt unter dem Namen CEA, stellt den bekanntesten Vertreter der CEACAM-Familie dar. Erstmals wurde CEA in fötalem Lebergewebe und Kolonadenokarzinomgewebe nachgewiesen (Gold und Freedmann, 1965). Wenig später wurde es mit Hilfe des Radioimmunassays im Serum von Patienten mit kolorektalen Karzinom und anderen Adenokarzinomen detektiert (Thomson et al., 1969). Das CEA ist ein glykolysiertes, 180 kDa Protein (Coligan et al., 1972; Westwood et al., 1974). Seine 7 Domänen sind homolog zu den konstanten als auch variablen Regionen der Immunglobulinketten (Paxton et al., 1987; Williams und Barclay, 1988).

Im klinischen Alltag gilt CEA aufgrund seiner oben genannten Eigenschaften als anerkannter Tumormarker zur Bewertung des postoperativen Verlaufs und dient als Prognoseparameter (Sikorska et al., 1988; Goldstein und Mitchell, 2005). Ein postoperativer Anstieg des CEA kann ein rezidivierendes Krankheitsgeschehen bedeuten, noch bevor Hinweise in der bildgebenden Diagnostik erkenntlich sind (Thompson et al., 1991). Jedoch kann CEA auch unspezifisch bei entzündlichen Erkrankungen der Gallenblase und Leber, sowie in Lungen von Rauchern und bei anderen Neoplasien erhöht sein. Deshalb ist es als Screeningmethode zur Früherkennung eines Adenokarzinoms ungeeignet (Chevinsky, 1991; Ballesta et al., 1995). Funktionell scheint das CEA an der Entstehung von Metastasen beteiligt zu sein (Hofstetter et al., 1990; Screatton et al., 2000), indem es die Gewebearchitektur

und Zellpolarisation zerstört (Ilantzis et al., 2002; Ordonez et al., 2007). Deshalb wird CEA intensiv als Zielstruktur für die Behandlung von Adenokarzinomen mit monoklonalen Antikörpern und mit T-Lymphozyten mit CEA-spezifischen natürlichen oder rekombinanten T-Zellrezeptoren erforscht (Hombach et al., 1999; Stein und Goldberg, 2004; Blumenthal et al., 2005; Shirasu et al., 2010).

Auch CEACAM1 ist von besonderem Interesse für die Tumorentstehung. Es konnte eine Herunterregulierung in verschiedenen Adenokarzinomen festgestellt werden und scheint somit in Epithelzellen als Tumorsuppressor zu fungieren (Estrera et al., 2001). Beispielsweise sagt ein Verlust von CEACAM1-Expression in Hepatoblastom-Patienten eine metachrone pulmonale Metastasierung und eine schlechtere Überlebensrate voraus (Tsukada et al., 2009). In intestinalen Zellen nimmt CEACAM1 am *Wnt signaling* teil und fungiert als Tumorsuppressor. Seine Herunterregulierung führt folglich zu Tumorwachstum und –progression (Leung et al., 2008). Dagegen scheint seine vermehrte Expression in Melanomzellen die Invasion zu fördern und somit das Überleben der Patienten zu verschlechtern (Ebrahimnejad et al., 2004). Markel et al. konnten zeigen, dass CEACAM1 statistisch signifikant in Patienten in einer aktiven Melanom-Erkrankung ansteigt. Auch korreliert ein höherer CEACAM1-Spiegel mit schlechteren Überlebenschancen (Markel et al., 2009). Desweiteren ist CEACAM1 an der Regulierung von T-, B- und natürlichen Killerzellen, an der Angiogenese, sowie an der Differenzierung von dendritischen Zellen beteiligt (Kammerer et al., 1998; Ergün et al., 2000; Markel et al., 2002; Greicius et al., 2003; Chen et al., 2004; Shao et al., 2006; Zhou et al., 2009). Auch scheint CEACAM1 regulierende Funktionen im Insulin-Haushalt zu übernehmen und bildet eine Brücke zum Lipidstoffwechsel (DeAngelis et al., 2008). Sobald CEACAM1 durch den Insulinrezeptor phosphoryliert wird, nimmt es an der Insulin-Rezeptor Endozytose teil und bewirkt dadurch die Aufnahme von Insulin in die Hepatozyten (Li Calzi et al., 1997; Najjar et al., 2002). Wurde in Mäusen leberspezifisch das CEACAM1-Gen inaktiviert, entwickelten die Tiere aufgrund von Hyperinsulinämie durch den Verlust der Insulin-Clearance eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) (Lee et al., 2008).

In Menschen wird CEACAM1 von bakteriellen Pathogenen als Rezeptor genutzt, wie beispielsweise durch *Neisseria spezies*, *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* (Chen et al., 1997; Hill et al., 2003; Virji et al., 2000). Hierbei nutzt *Haemophilus influenzae* das Protein P5, *Moraxella catarrhalis* dagegen bedient sich

des USPA1 (*ubiquitous surface protein A1*)-Antigens als Adhäsion (Hill et al., 2001; Hill et al., 2003). Besonderes Interesse galt dem *opacity-associated* (Opa)-Proteinen der Neisserien, welche sich an die N-Domäne von CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 und CEACAM6 binden (Bos et al., 1999; Popp et al., 1999; Hauck et al., 2003; Kuespert et al., 2007). So erlaubt die Opa-CEACAM1-Bindung Bakterien über Internalisierung den Eintritt in intaktes Epithelgewebe. Weiterhin wird eine Transzytose der rezeptorgebundenen Bakterien in weitere Zellen ermöglicht, welche nach erfolgreicher Kolonisation in Wirtszellen entsprechendes Krankheitsbild auslösen können (Bradley et al., 2005; Wang et al., 1998; Gray-Owen, 2003; Muenzner et al., 2005). Interessanterweise verhindert die Bindung von Opa-exprimierenden Bakterien an CEA in Epithelzellen der Vagina von Human-CEA-transgenen Mäusen die normalerweise als Abwehrreaktions des Wirts gesehene verstärkte Ablösung von Epithelzellen (Exfoliation). Dies scheint eine evolutionäre Adaptation zur Ermöglichung von Kolonisierung durch solche Pathogenen dazustellen (Muenzner et al., 2010). Jedoch werden CEACAM-bindende Bakterien von dem angeborenen Immunsystem spezifisch durch Bindung an das granulozytenspezifisch exprimierte CEACAM3 erkannt und nach Endozytose von den Granulozyten eliminiert (Virji et al., 1996; Chen et al., 1996; Hauck et al., 2003; Schmitter et al., 2004). Dieser Mechanismus erfolgt Opsonin-unabhängig. Src-Proteintyrosinkinasen scheinen für eine effiziente Internalisierung essentiell zu sein (Schmitter et al., 2007). Obwohl Granulozyten verschiedene CEACAMs exprimieren, konnte eine effiziente Aufnahme und Eliminierung des Bakteriums nur CEACAM3 zugeordnet werden (Schmitter et al., 2004; Kuspert et al., 2006; Pils et al., 2008).

CEACAM16 ist der einzige sezernierte Vertreter der CEACAM-Familie. CEACAM16-mRNA konnte nur im Corti-Organ des Innenohrs und in Spuren im Cerebellum nachgewiesen werden (Zebhauser et al., 2005; Kammerer et al., 2012). Kürzlich konnte mit Hilfe von *Knock-out*-Mäusen gezeigt werden, dass es im Innenohr eine essentielle Funktion beim Hören niedrig- und hochfrequenter Töne übernimmt und eine Relevanz in der Genese einer bestimmten Form nicht-syndromischer Taubheit (DFNA4) besitzt (Zheng et al., 2011; Kammerer et al., 2012).

Sowohl CEACAM6, als auch CEACAM7 wurden in normalem Kolongewebe im Bereich der Glykokalyx detektiert, als Anteile des *fuzzy coat* (Frängsmyr et al., 1999). CEACAM7 wurde nur in der apikalen Region hochdifferenzierter Epithelzellen gefunden, sowie in isolierten duktalem Zellen des Pankreas. Hingegen wurde

CEACAM6 in Epithelgewebe verschiedener Organe und auch in Granulozyten nachgewiesen. Im normalen Kolon konnte CEACAM6 und CEACAM7 in der Apoptose-Region und nicht in hoch-proliferierenden Zellen gefunden werden. Jedoch zeigte CEACAM6 in hyperplastischen Polypen und Adenomen eine erweiterte Expression und Hochregulierung, während CEACAM7 völlig verschwand (Neumaier et al., 1993; Thompson et al., 1994; Schölzel et al., 2000). Dagegen konnte in Adenokarzinomen des Magens eine Hochregulierung von CEACAM6, CEACAM7, CEACAM5 und auch CEACAM1 festgestellt werden (Kinguasa et al., 1998).

CEACAM6 ist in einer Reihe von Tumoren, wie Kolon-, Mamma-, Magen-, Pankreas-, Leber- und Lungenkarzinom überexprimiert (Allard et al., 1994; Kuroki et al., 1999; Baranov et al., 1994; Schölzel et al., 2000; Duxbury et al., 2004). Hierbei wird die Zellpolarisation und die Gewebearchitektur zerstört und Anoikis (Zelltod nach Kontaktverlust) gehemmt. Folglich ist es an der Tumorgenese, Invasion und Metastasierung beteiligt und zeigt damit einen ähnlichen Einfluss auf Zellen wie das CEA (Ordonez et al., 2000; Ilantzis et al., 2002; Wirth et al., 2002; Duxbury et al., 2004; Lewis-Wambi et al., 2008). Deshalb wird momentan auch untersucht, ob CEACAM6 ein effektives Zielmolekül für die Immuntherapie von Karzinomen darstellt. Erste *In-vivo*-Versuche zeigen einen antimetastatischen Effekt und resultieren in einem verlängerten Überleben der Versuchstiere mit Metastasen (Blumenthal et al., 2005).

In *Morbus-Crohn*-Patienten wurde eine abnorme intestinale Expression von CEACAM6 gefunden. Dieses könnte zu einer Kolonisation der Mucosa mit pathogenen adhärent-invasiven *Escherichia coli* (*E. coli*) beitragen, welche eine Entzündung der Mucosa auslöst (Carvalho et al., 2009).

CEACAM3, CEACAM4 und CEACAM8 werden ausschließlich auf Granulozyten exprimiert (Nagel et al., 1993; Kuroki et al., 1995; Kuroki et al., 2001; Zhao et al., 2004; Schmitter et al., 2007; Pils et al., 2008).

1.3.2 PSG-Subgruppe

Ihre Mitglieder bestehen beim Menschen aus einer IgV-ähnlichen Domäne und zwei bis drei IgC-ähnlichen Domänen. Weiterhin sind sie nicht in der Zellmembran verankert (Thompson et al., 1991; Teglund et al., 1995; McLellan et al., 2005). Alle elf bisher bekannten humanen Mitglieder werden durch die plazentaren

Synzytiotrophoblasten sezerniert und vor allem in der Spätschwangerschaft reichlich in die maternale Zirkulation abgegeben (Teglund et al., 1995; Zhou et al., 1997). Die Funktion der PSGs ist noch nicht vollständig entschlüsselt, jedoch sind niedrige PSG-Konzentrationen in maternalem Blut mit Abort, intrauteriner Wachstumsretardierung und fötaler Hypoxie assoziiert (Würz et al., 1981; Masson et al., 1983; Silver et al., 1993). Weiterhin gibt es Hinweise, dass die PSGs eine Abstoßung des allogenen Fötus durch Modulation des maternalen Immunsystems verhindert. Beispielsweise konnten humane Monozyten zur Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen angeregt werden, wenn sie mit PSG behandelt wurden. In Einzelnen konnte gezeigt werden, dass PSG1, PSG6 und PSG11 die Sekretion von IL-10, IL-6 und TGF- β 1 induzieren. Weiterhin konnte nahe gelegt werden, dass murine PSGs das Gleichgewicht der maternalen Immunabwehr vom TH1 zur TH2-Abwehr verschieben, um histoinkompatible Schwangerschaften zu ermöglichen (Wessels et al., 2000; Snyder et al., 2001).

1.4 ITAM-vermittelte Signaltransduktion

ITAM-Motive bestehen aus einer Konsensusaminosäuresequenz mit phosphorylierbaren hochkonservierten Tyrosinresten (Y), wobei x eine beliebige Aminosäure sein kann: D/ExxYxxL/Ix₆₋₁₂YxxL/I (Reth, 1989). Sie werden in verschiedenen Immunrezeptor-Komplexen von hämatopoetischen Zellen gefunden (Cambier et al., 1995; Haks et al., 2001; Mocsai et al., 2006) und sind für die Weiterleitung von Signalen verantwortlich, die zu Proliferation, Differenzierung, Phagozytose und Apoptose führen können (Indik et al., 1995; Wang et al., 2006). Grande et al. publizierten Daten, die eine Beteiligung von ITAM-Motiven beim Überleben von Epithelzellen nahe legen. Die Initiierung der Signaltransduktion nach Aktivierung des ITAM-tragenden Rezeptors oder Rezeptorkomplexes findet durch Proteintyrosinkinasen wie BKL, LCK, LYN und FYN der Src-Familie statt. Hierbei werden meist beide Tyrosine des ITAM-Motivs durch die Kinasen phosphoryliert. Hieran können nun *Src homology 2* (SH2)-Domänen-enhaltende Proteine binden, wie beispielsweise *spleen tyrosine kinase* (SYK), ZAP-70, *Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase* (LYN), p85, PLP- γ 2, *Ras GTPase-activating protein 1* (RASA1), VAV, SH2-enhaltende Proteintyrosinphosphatase 1/2 (Aoki et al., 1995; Lee et al., 2005). ZAP-70 kommt nur in T-Zell verwandten Zellen vor, während SYK in Epithel, Endothel und Leukozyten vertreten ist (Chan et al., 1994; Chu et al., 1999). SYK und

ZAP-70 können sich entweder autophosphorylieren oder weitere *Downstream*-Partner wie die *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), *extrazellulär signal-related kinases* (ERKs) und den *nuclear factor* (NF)- κ B durch Tyr-Phosphorylierung aktivieren (Jiang et al., 1998; Niirö and Clark, 2002; Lee et al., 2005; Grande et al., 2006).

Ursprünglich in Signalproteinen des Immunsystems entdeckt, wurden in letzter Zeit ITAM-Motive auch vermehrt in Epithelzellen exprimierten Proteinen gefunden und untersucht (Fodor et al., 2006). Viren benutzen das ITAM-Motiv, um einen transformierenden Effekt auf ihre Wirtszelle auszuüben. Das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus nutzt für die Immortalisierung von Endothelzellen das Protein K1. Dieses Protein besitzt ein ITAM-Motiv mit zwei SH2-Bindungsmotiven, Phosphorylierung dieses Motivs induziert weitere Signalkaskadenwege, welche durch Induktion von inflammatorischen Zytokinen Tumorentstehung fördern (Lee et al., 2005; Wang et al., 2006). Auch das *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV) *envelope* (*Env*) *protein* enthält ein ITAM-Motiv, welches eine Rolle bei der Virus-induzierten Mammakarzinogenese in Mäusen spielt. Es ist für die immortalisierende Wirkung auf Mammaepithelzellen verantwortlich. Die Mutation der Tyrosin-Reste des ITAM-Motivs in Phenylalanin des Env-Proteins, ändert nichts an der initialen Infektion, jedoch ist die Fähigkeit des Virus, Zellen morphologisch zu verändern und Tumore zu induzieren, eingeschränkt (Ross et al., 2006). Weiterhin äußerten Grande et al. die Vermutung, dass membrangebundene ITAM-Motive alleine, eine Rolle in der soliden Tumorentstehung haben könnten. Sie überexprimierten hierfür ein rekombinantes Protein in immortalisierten murinen Brustepithelzellen und Fibroblasten der Mamma. Das Protein bestand aus der ITAM-enthaltenden zytoplasmatischen Domäne von Ig α und Ig β , Komponenten des B-Zell-Antigen-Rezeptors, welche *per se* keine transformierende Wirkung besitzen. Mammaepithelzellen und auch Fibroblasten zeigten nach Expression dieses Konstrukts verminderte Adhärenz und einen Verlust der typischen zellmorphologischen Kennzeichen. Der transformierende Effekt konnte sowohl durch Austausch der Tyrosine gegen Phenylalanine, als auch durch Hemmung des *Downstream*-Partners SYK verhindert werden. Somit können ITAM-enthaltende Proteine in nicht hämatopoetischen Zellen als Onkoprotein fungieren, indem sie *Downstream*-Partner aktivieren (Grande et al., 2006). Auch ist die Integrin-Signaltransduktion von ITAM-Motiv-enthaltenden Adaptorproteinen in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten abhängig (Mocsai et al., 2006). Der ITAM-

Downstream-Partner SYK übernimmt wichtige Funktionen in einer Vielzahl von Zellen. Gefunden wurde es unter anderem in Epithelzellen, Fibroblasten, hämatopoetischen Zellen und Gefäßendothelzellen (Yanagi et al., 2001). SYK wird in normalem Brustgewebe, jedoch nicht in invasivem Brustkrebs detektiert. Nach Aktivierung durch ein ITAM scheint SYK die Funktion eines Tumorsuppressors zu übernehmen (Coopmann et al, 2000). In Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs und dessen Lymphknotenmetastasen konnte eine vermehrte Expression von SYK gefunden werden. Diese gesteigerte Expression korrelierte mit einer kürzeren Überlebenszeit (Luangdilok et al., 2007).

1.5 Aktueller Wissensstand zu CEACAM20

In der Maus konnte Ceacam20-mRNA in einer Reihe von Normalgeweben wie in Dickdarm-, Dünndarm- und Hodengewebe, sowie in Karzinomgewebe von Magen- und Brusttumoren nachgewiesen werden. Auffallend war die Tatsache, dass Ceacam20-mRNA in Magennormalgewebe überhaupt nicht und in normalen Brustdrüsengewebe kaum detektiert werden konnte (Zebhauser et al, 2005). Somit könnte es im Rahmen einer malignen Entartung zu einer Hochregulation von *Ceacam20* kommen. In menschlichem Gewebe wurde CEACAM20-mRNA bereits in Prostata und Dünndarm (Paptistella, 2009), sowie in geringerer Ausprägung auch in Pankreas, Hoden und Hypophyse detektiert (Eisenried, 2009). Zusätzlich zeigte sich in drei von vier Prostatakarzinomproben und in mehreren Prostatakarzinomzelllinien CEACAM20-mRNA-Expression (Eisenried, 2009). Vergleichend ähnelt somit die mRNA-Expression von humanem Gewebe dem Expressionsmuster der Maus.

Eine Besonderheit von CEACAM20 ist das in seinem zytoplasmatischen Bereich liegende ITAM. Im Einbuchstabencode lautet die Sequenz dieses Motivs ESIYEE LVNPEPNTYIQL und entspricht damit perfekt der ITAM-Konsensussequenz E/DxxYxxI/Lx₆₋₁₂YxxI/L (Reth, 1989). Dieses Konsensusmotiv ist in CEACAM20 aller bisher untersuchten Säugetier-Spezies hochkonserviert (Abbildung 4).



Abbildung 4: Konservierung von potentiellen Signaltransduktionssequenzen in der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM20 in neun verschiedenen Spezies. Die Namen, Grenzen und Phasen (0, 1, 2) der für die zytoplasmatische Domäne kodierenden Exonen sind oberhalb der verglichenen Aminosäuresequenzen im Einbuchstabencode angegeben. Rot gedruckt sind Aminosäuren, die in allen Spezies identisch sind, beispielsweise das ITAM-Motiv. Blau und Grün symbolisieren relativ gut konservierte Aminosäuren, während schwarze Aminosäuren in den einzelnen Spezies unterschiedlich sind. Neben dem ITAM befindet sich ein hypothetisches *GRB2-like SH2 domains binding motif* (Skolnik et al., 1993), das ebenso stark konserviert ist. Unterhalb der verglichenen Sequenzen sind die Konsensussequenzen angegeben. Bta, *Bos taurus* (Rind); Ssc, *Sus scrofa* (Wildschwein); Cfa, *Canis familiaris* (Hund); Fca, *Felis catus* (Katze); Hsa, *Homo sapiens* (Mensch); Ppy, *Pongo pygmaeus* (Orang-Utan); Ptr, *Pan troglodytes* (Schimpanse); Mml, *Macaca mulatta* (Rhesusaffe); Cja, *Callithrix jacchus* (Weißbüscheläffchen); Mmu, *Mus musculus* (Maus); Rno, *Rattus norvegicus* (Ratte) (Kammerer und Zimmermann, 2010, modifiziert).

Aufgrund von Vorversuchen (Paptistella, 2009) gibt es Hinweise, dass in der Signalkaskade von CEACAM20 die ITAM-Motiv-bindende Tyrosinkinase SYK eine entscheidende Rolle spielen könnte. In der Literatur wurden Signalkomponenten bei ITAM-vermittelter Signaltransduktion beschrieben. Basierend hierauf ergibt sich folgender hypothetischer Mechanismus der CEACAM20-vermittelten Signaltransduktion, der in dieser Arbeit als Arbeitshypothese diente (Abbildung 5).

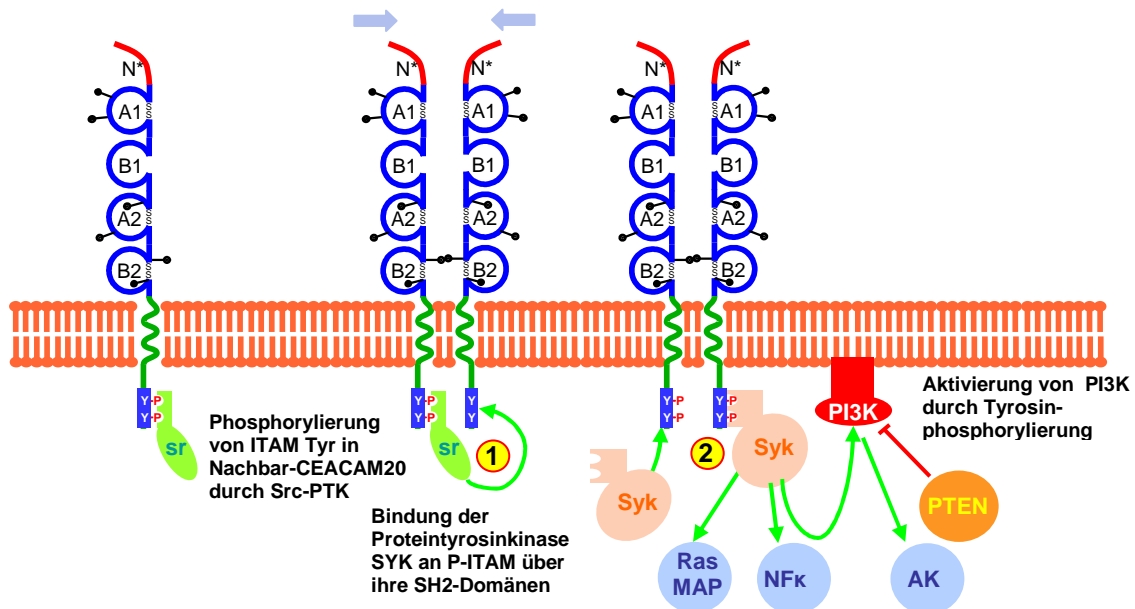


Abbildung 5: Hypothetischer ITAM-vermittelter Signaltransduktionsweg von CEACAM20. Die Aktivierung von CEACAM20 durch einen noch unbekannten Liganden induziert die Phosphorylierung der Tyrosine im ITAM durch Src-Kinasen (1). Nun bindet SYK über seine SH2-Domäne an das ITAM, was zu seiner Aktivierung führt (2). Durch SYK-vermittelte Tyrosinphosphorylierung von Downstream-Partnern werden weitere Signalkaskaden ausgelöst, die letztendlich Proliferation und Differenzierung nach sich ziehen (Zimmermann, unveröffentlicht).

1.6 Zielsetzung der Dissertation

Bei einer systematischen Suche nach noch nicht bekannten Mitgliedern der CEA-Familie wurde das transmembran verankerte CEACAM20 entdeckt. Auffallend war bei der Analyse von murinem Gewebe, dass *Ceacam20*-mRNA in Magenkarzinomgewebe im Gegensatz zum Magennormalgewebe wesentlich stärker exprimiert wurde (Zebhauser et al., 2005). Dies lässt die Vermutung zu, dass es bei einer malignen Entartung zur Hochregulation von *Ceacam20* kommt. Interessanterweise enthält CEACAM20 in seiner zytoplasmatischen Domäne ein authentisches ITAM-Motiv, das in verschiedenen viralen Proteinen bei deren Überexpression zur malignen Entartung beiträgt. Gegenwärtig ist unklar, ob CEACAM20-Überexpression kausal mit der Tumorentstehung oder Progression verknüpft ist. Auch ist seine Funktion im gesunden Organismus unbekannt. Zudem gibt es bisher keine Information über die Adhäsionseigenschaften von CEACAM20.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte daher geklärt werden, ob eine Hochregulation von *CEACAM20* bei Entstehung humaner Magenkarzinome und in davon abgeleiteten Zelllinien wie in der Maus beobachtet wird. Weiterhin wurden der Einfluss von CEACAM20-Überexpression und die Bedeutung des ITAM-Motivs für Zellproliferation und Zellvitalität untersucht.

Mithilfe des Tet-on-Systems konnte kontrolliert über die Zugabe von Doxyzyklin eine Expression des CEACAM20-Proteins erreicht werden. Die gezielte Einführung von Punkt- und Deletionsmutationen diente der Klärung, ob das ITAM-Motiv wichtig für den zu beobachtenden Phänotyp ist. Des Weiteren sollte untersucht werden, mit welchem Signaltransduktionspartner(n) CEACAM20 interagiert.

Diese Untersuchungen sollen zum Verständnis der Funktion von ITAM-tragenden Rezeptoren in Epithelzellen und der möglichen Rolle bei Entstehung und Progression epithelialer Tumore beitragen.

2 Materialien

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Agarose, Electrophoresis Grade	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Amplex™ Red	MoBiTec, Göttingen
Aquatex®	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
BSA (<i>albumine bovine fraction V</i>)	Sigma, Taufkirchen
CellTiter-Blue®	Promega, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue	Pierce, Rockford, Illinois
Dimethylformamid	Sigma, Taufkirchen
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
DNA-Größenmarker 1-kb-Leiter, 100-bp-Leiter	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>doxycycline hyclate</i>	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Bio-Rad, München
Ethylaminocarbazol	Sigma, Taufkirchen
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
FuGene HD	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Glycerin	VWR International GmbH, Darmstadt
Glycin	Sigma, Taufkirchen
HEPES	GIBCO BRL, Karlsruhe
Hybond Blotting Paper	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK
Hybond P	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK
Hygromycin	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Iodacetamid	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Lipofectamine 2000	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Mayers Hämalunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MEM NEAA	Gibco BRL, Karlsruhe
Natrimpyruvate	Gibco BRL, Karlsruhe
Nonidet® P40	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Western blot-Puffer	
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (10x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Orthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S-Lösung	Sigma, Taufkirchen

PBS-Pulver	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Karlsruhe
Precision Plus Protein™ Dual Colour Standards	Bio-Rad, München
Protease-Inhibitor-Cocktail Complete Mini	Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim
Protein G Sepharose®, Fast Flow	Sigma, Taufkirchen
RNA 6000 Pico Marker	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Rotihistol® (Xylolersatz)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640, Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer, 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Target Retrieval Solution	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
TCEP-HCl	Pierce, Rockford, Illinois
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung	Sigma, Taufkirchen
5 % Trypsin-EDTA Lösung (10x)	Gibco BRL, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid, 30%	Merck, Darmstadt

2.2 Enzyme und Kits

Antarctic Phosphatase	New England BioLabs, Schwalbach
DNA-Gelextraktions-Kit	Eppendorf, Hamburg
DNA Polymerase I large fragment (Klenow)	New England BioLabs, Schwalbach
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit	Omega Bio-Tek, Norcross, USA
ImmPRESS™	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen FastDigest® Enzyme (<i>Xho</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RV, <i>Eco</i> RI) <i>Sfi</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot Fermentas, St. Leon-Rot
Light Cycler® FastStart DNA Master ^{Plus} SYBR Green I	Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim
Genomische DNA-Präparation: NucleoBond Xtra Maxi Plus QIAprep Spin Miniprep Kit	Macherey-Nagel, Düren Qiagen, Hilden
<i>PfuUltra</i> ® High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene, Amsterdam
Reverse Transkription	Promega, Mannheim
RNA 6000 Pico Kit	Technologies, Santa Clara, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Quick Start™ Bradford Protein Assay	Bio-Rad, München
Quick Start™ Bradford Dye Reagent (1x)	Bio-Rad, München

2.3 Verbrauchsmaterialien

Einfrier Röhrchen CryoTube™ Vials	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Einmalhandschuhe Sempercare	Semperit Technische Produkte GmbH & Co. KG, Wien, Österreich
FACS-Röhrchen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Kulturflaschen Nunclon™ Surface	Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark
Light Cycler® Capillaries (20 µl)	Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml; Lid _{Bac})	Eppendorf AG, Hamburg
Sterile Filter-Spitzen (10, 20, 200, 1000 µl)	Biozym, Hess. Oldendorf
Sterile Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark
Sterilen Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm)	Millipore, Billerica, Massachusetts
Western blot NuPAGE® 4-12% Bis-Tris-Gel Super Signal® West Pico Trial Kit Hyperfilm™ ECL	Pierce, Bonn Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Zellkulturplatten (6-well, 96-well)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Zellkulturschale (20 mm x 100 mm)	Falcon, Heidelberg

2.4 Geräte

Agilent Bioanalyzer 2100, RNA 6000 Pico Chip	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Durchflussszytometer Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Elektrophoresekammer horizontal	Gibco BRL, Karlsruhe
FACS flow	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
FLUOstar Optima	BMG Labtech, Offenburg
Geldokumentationssystem Fluor-S Multilimager™	Bio-Rad, München
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Hypercassette™	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Inkubationsschrank	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau
Kryostat Leica CM3050 S	Leica Microsystems GmbH, Mannheim
Light Cycler®	Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler Centrifuge Adapters™ und Kühlblock	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Magnetrührer RCT Basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mikropipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Massenspektrometer (LC/MC/MS) Quattro Premier XE	Waters, Milford, USA
Mikroskop	Leica DMIL, Leica Microsystems GmbH, Mannheim
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35	Zeiss, München

Mikrowelle Micromat	AEG, Nürnberg
Pipettierassistent Pipetpoy acu	Hirschmann, Neckartenzlingen
Schüttler CERTOMAT® H	B. Braun Biotech International, Melsungen
Sterilbank HERA safe HS12	Heraeus Instrumente GmbH, Hanau
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim, Sulzbach
Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC200	MJ Research Inc., Watertown, USA
Vortex VF2	IKA Labortechnik, Staufen
Waagen: Präzisionswaage BP2100 Analysewaage MC1	Sartorius AG, Göttingen Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad Julabo 19	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Western blot XCell SureLock™ Electrophoresis Cell XCell II™ Blot Module Röntgenentwicklungsgerät Scopix LR5200	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe Agfa, Köln
Zentrifugen DNA Speed Vac DNA110 MIKRO 20 Megafuge 2.0 Shandon Zentrifuge Varifuge 3.0R	Savant Instruments, New York Hettich AG, Bäch, Schweiz Heraeus Instrumente GmbH, Hanau Thermo, Langenselbold Heraeus Instrumente GmbH, Hanau

2.5 Antikörper

Polyklonales Serum

Maus-Anti-CEACAM20-Serum	A. Eisenried, Labor für Tumorimmunologie (LTI), Klinikum Großhadern, Ludwigs-Maximilians- Universität (LMU), München
--------------------------	---

Nicht-konjugierte Antikörper

Maus-Anti-CEACAM20 Klon 6G4A5	Aldevron/Genovac, Freiburg
Maus-Anti-Phosphotyrosin Klon 4G10 (IgG2b)	Upstate, Lake Placid, USA
Kaninchen-Anti-SYK (N-19)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Maus-Anti-β-Aktin	Sigma, Taufkirchen

Horse raddish peroxidase (HRP)-konjugierte Antikörper

Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin (Ig) HRP	Vector, Burlingame, USA
Kaninchen-Anti-Maus-Ig-HRP	DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark
Schaf-Anti-Maus-Ig-HRP	Amersham, Bioscience, Buckinghamshire, UK
Esel-Anti-Kaninchen-Ig-HRP	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK

Fluoreszenzmarkierte Antikörper

Ziege-Anti-Maus-Ig-RPE	DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark
Ziege-Anti-Maus-Ig-FITC	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

2.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotidsequenzen (humane Gene) sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Fett gedruckte Nukleotide stellen die eingefügte Einzelbasenmutation, im Fall des CEACAM20- Δ Cyt-r das eingefügte Stoppcodon dar. Eine eingeführte SfiI-Schnittstelle (GGCCNNNNNGGCC) zum Klonieren ist unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz
CEACAM20-Y511F-f	CCTGAGTCCTGAGT TTT GCAATATATCC
CEACAM20-Y511F-r	GGGATATATTGCAA AACT CAGGACTCAGG
CEACAM20-Y536F-f	TCCAGAGGAGACCT TTT GAGACGAAGCTGC
CEACAM20-Y536F-r	GCAGCTTCGTCTCA AAGGT CTCCTCTGGA
CEACAM20-Y578F-f	CATGGAGTCAATCT TTT GAGGAGCTTGTGA
CEACAM20-Y578F-r	TCACAAGCTCCTCA AAGATT GACTCCATG
CEACAM20-Y589F-f	AGAGCCCAACACT TTT CATCCAAATCAACC
CEACAM20-Y589F-r	GGTTGATTTGGATGA AAGT GTTGGGCTCT
CEACAM 20- Δ Cyt-r	CAGTGGCCTCACTGGCCT TCAG GGCCGTCTGGCATTCTG
pRTS-CEACAM20-f	GGGATCCTCTAGTCAGCAAGCTTTT
pRTS-CEACAM20-r	TCAGCTCTAGAGACTCAGTCGACAGC
CEACAM20N-f	CCACCCAAAGTGAGGATGTT
CEACAM20A1-r	ATCTTGCCATCCTTGGACAG
SYK-f	ATGGAGATGGCAGAACTTGG
SYK-r	CTTGACAGGCCACTTTCCAT

2.7 Bakterien

XL1-Blue Competent Cells | Stratagene, Amsterdam

2.8 Zelllinien

HEK293T	LTI, LMU, München
W25+	LTI, LMU, München
Cos7-C20	M. Paptistella, LTI, LMU München

2.9 Gewebe

Ovar-Paraffinschnitte	C. Weiler, Pathologie Großhadern, LMU München
Magenkarzinom, Typ I+II, Paraffinschnitte	C. Weiler
Magenkarzinomgewebe	N. van den Engel, Chirurgie Großhadern, LMU München
Magennormalgewebe	N. van den Engel, Chirurgie Großhadern, LMU München

2.10 RNA

GC1	N. van den Engel, Chirurgische Klinik, LMU München
GC9	N. van den Engel
GC20	N. van den Engel
GC34	N. van den Engel
GC38	N. van den Engel
GC50	N. van den Engel

2.11 Verwendete Vektoren

pcDNA3.0-CEACAM20	M. Paptistella, LTI, LMU München
pCTWOSFI	A. Herbst, Med. 2, LMU München
pRTS	A. Herbst, Med. 2, LMU München
SYK-pcDNA3.1 Zeo	B. Walzog, LMU, München

2.12 Software und Internetadressen

Ensembl	http://www.ensembl.org
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Network Protein Sequence @nalysis	<i>Pôle Bioinformatique Lyonnais</i>
Primer3	Steve Lincoln, Mark Daly, Eric S. Lander
Vektor NTI™	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Agaroselektrophorese diente dazu, DNA-Fragmente, beispielsweise aus einem Restriktionsendonukleaseverdau, ihrer Länge nach aufzutrennen. Da DNA aufgrund ihrer Phosphatgruppen eine negative Ladung besitzt, wandern die DNA-Fragmente bei einer angelegten Spannung von 70-90V in Richtung der Anode. Hierbei wandern kleine Fragmente schneller als große. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurde ein TAE-Agarosegel in einer Konzentration zwischen 0,7%-2% verwendet, um eine optimale Auftrennung zu erreichen. Weiterhin wurde das Gel mit Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,2 µg/ml versetzt, damit die Fragmente in der UV-Transilluminatuion sichtbar wurden. Bevor die DNA aufgetragen wurde, musste noch ein DNA-Auftragpuffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) in 1:6 Verdünnung zugegeben werden. Dieser bewirkte, dass die Probe an den Grund der Geltasche sank und der enthaltene Farbstoff kennzeichnete die Elektrophoresefront. Um später bei der Auswertung die Fragmentgröße vergleichen zu können, wurde ein DNA-Marker (*DNA-Ladder*, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) mitgeführt. Bei präparativen Gelen wurde die gewünschte Bande mit Hilfe eines Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und mit einer sterilen Pinzette in ein Eppendorfröhrchen gegeben. Entweder wurde das Gelstückchen danach bei -20 °C aufbewahrt oder sofort weiterverarbeitet.

3.1.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Ausgeschnittene Agarosegelstücke wurden erst gewogen (das maximale Gewicht pro Säule beträgt 400 mg) und danach mit dem *Perfekt Prep Gel Cleanup Kit* (Eppendorf, Hamburg) aufbereitet. Das ausgeschnittene Gelstück wurde mit der 3-fachen Menge an Solubilisierungspuffer versetzt und bei 50 °C gelöst. Nun wurden 100% Isopropanol hinzugefügt und alles auf eine Silikamembransäule überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 17.900x g. Die Adsorption von Nukleinsäuren an die Membran benötigt eine hohe Konzentration an chaotropen Salzen und einen pH <7,5. Die Salze wurden durch Waschen mit einem Ethanol-haltigem Puffer

entfernt. Ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt entfernte Ethanol- und Salzurückstände. Anschließend erfolgte die Elution mit 30 µl destilliertem Wasser, welches einen pH zwischen 7 und 8,5 haben sollte, um eine bestmögliche Elutionseffizienz zu gewähren. Die eluierte DNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20 °C aufbewahrt. Aufgrund der Größe des pRTS-Vektors mit 17.329 bp, wurde für diesen das *E.Z.N.A. Gel Extraction Kit* (Norcross, USA) verwendet, welches auf die Aufreinigung von großen DNA-Fragmenten spezialisiert ist. Dieses funktioniert ähnlich dem oben genannten Prinzip und wurde nach der Methodenbeschreibung der Firma durchgeführt.

3.1.3 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurden verschiedene Plasmide verdaut. Hierfür wurden *Fast Digest Enzyme* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet, wie beispielsweise *XhoI*, *HindIII*, *EcoRI* und *EcoRV*.

Hierbei wurde folgender Ansatz verwendet:

Bestandteile	Volumen
DNA (1 µg/µl)	1 µl
Puffer (10x)	1,5 µl
Enzym 1 (10 U/µl)	0,5 µl
Enzym 2 (10 U/µl)	0,5 µl
dH ₂ O	ad 15 µl

Der Restriktionsansatz wurde für 5 min bei 37 °C verdaut und für 20 min bei 80 °C inaktiviert. Das Restriktionsenzym *SfiI* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) wurde folgendermaßen verwendet:

Bestandteile	Volumen
DNA (1 µg/µl)	3 µl
Puffer Grün (10x)	3 µl
<i>SfiI</i> (10 U/µl)	3 µl
dH ₂ O	ad 30 µl

Der Restriktionsansatz wurde 4 h bei 50 °C inkubiert. Die Inaktivierung fand für 20 min bei 80 °C statt. Wurden mit dem *SfiI*-Enzym PCR-Fragmente verdaut, erfolgte der Verdau für 16 h bei 50 °C.

3.1.4 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung von Vektoren diente dazu, eine Religation zu verhindern. Die Phosphatgruppen wurden, je nach Vektor, am 5'- oder 3'-Ende entfernt. Verwendet wurde hierzu die *antarctic phosphatase* (New England Biolabs, Schwalbach). Für 3'-Enden wurde 1 h bei 37 °C und für 5'-Enden 30 min bei 37 °C inkubiert.

Hierbei galten in der Tabelle genannte Bedingungen:

Bestandteile	Volumen
Vektor	17 µl
Puffer (10x)	2 µl
<i>Antarctic phosphatase</i> (5 U/µl)	1 µl
dH ₂ O	ad 20 µl

3.1.5 Aufreinigung von DNA

Nach einem Restriktionsverdau oder einer Dephosphorylierungsreaktion erfolgte eine Aufreinigung mit dem *PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers.

3.1.6 Ligation

Zur Durchführung einer Ligation wurde das *Rapid Ligation Kit* (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die DNA-Menge wurde mit Hilfe einer mitgeführten quantifizierbaren DNA-Leiter durch Gelelektrophorese abgeschätzt, damit Vektor und zu integrierendes DNA-Fragment (*insert*) an ein molares 1:3-Verhältnis angepasst werden konnten. Als Negativkontrolle wurde in einem weiteren Ansatz anstatt des *inserts* Wasser eingesetzt. Die Ligation erfolgte für mindestens 5 min bei Raumtemperatur.

Für die Ligation wurden in der Tabelle angegebene Volumina verwendet:

Bestandteile	Volumen
Vektor (45 ng; 1 molarer Teil)	6 µl
Insert (x ng; 3 molare Teile)	1 µl
Puffer (5x)	4 µl
T4-DNA-Ligase (3 U/µl)	1 µl
dH ₂ O	ad 20 µl

3.1.7 Transformation kompetenter Bakterien

Mit Hilfe des kompetenten *E. coli*-XL1-Blue-Stammes (Stratagene, La Jolla, USA) wurde die Transformation nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. In drei Ansätzen wurden zu je 25 µl der Bakteriensuspension folgende Komponenten beigefügt:

- 1) pUC18-Plasmid (Positivkontrolle)
- 2) Negativkontrolle: Ligationsansatz enthält anstatt des *Inserts* Wasser
- 3) Ligationsansatz

Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Ansätze für 45 s bei 42 °C in einem Wasserbad hitzegeschockt und danach erneut für mindestens 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 42 °C warmem SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe). Nun wurde der Transformationsansatz bei 37 °C unter Schütteln (800 rpm) 1 h lang inkubiert. Zuletzt wurden die Ansätze einzeln auf den Platten mit Hilfe eines Drigalskispatels auf entsprechenden Agarplatten (LB-Medium, 1,5% Select Agar, 100 µg/ml Ampicillin) verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für weniger als 24 h im Brutschrank.

3.1.8 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der enzymatischen Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz. Sie ist durch Primer begrenzt, welche für diesen Bereich spezifisch sind. Die Kolonie-PCR diente beispielsweise zur Überprüfung der Anwesenheit des *inserts* nach Ligation und Transformation. Ein Teil der entsprechenden Kolonie wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze auf eine nummerierte Agarfläche übertragen und danach mehrfach in den PCR-Ansatz eingetaucht. Die in den Bakterien vorhandenen Plasmide dienten dabei als DNA-Matrize. Im ersten Reaktionszyklus erfolgte eine kurzzeitige Hitzebehandlung bei 95°C, wodurch die DNA in komplementäre Einzelstränge zerlegt wurde. Nun konnten die beiden Primer an den jeweils komplementären Bereich der einzelsträngigen DNA binden. Dieser Vorgang wird als *annealing* bezeichnet und fand bei einer bestimmten Temperatur statt, die durch die Länge und Basenzusammensetzung der Oligonukleotide bestimmt wurde. Durch eine hitzestabile *Taq*-Polymerase (Genecraft, Lüdingshausen) wurden die Einzelstränge in 5'→3' Richtung unter Verwendung von

dNTPs vervollständigt. Diese wurden nun auch im nächsten Zyklus denaturiert und dienten für den sich wiederholenden Reaktionszyklus als Matrize. Dadurch ist eine exponentielle Vermehrung der zu untersuchenden Zielsequenz gewährleistet. Weitere Details der Reaktion sind in den folgenden beiden Tabellen dargestellt. Nach Abschluss der Reaktion erfolgte die Analyse der Fragmentlänge mittels Elektrophorese in einem 2%-igen Agarosegel.

Für die PCR galten die in den Tabellen genannten Bedingungen:

Bestandteile	Volumen
Bakterienkolonie	-
Vorwärts-Primer (10 pg/μl)	0,8 μl
Rückwärts-Primer (10 pg/μl)	0,8 μl
Taq-Puffer (10x)	2,0 μl
dNTPs (25 mM)	2,0 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 μl
Taq-Polymerase (5 U/μl)	0,2 μl
dH ₂ O	ad 20,0 μl

Zyklus	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
Denaturierung	1	95	3
Denaturierung	2	95	1
Primeranlagerung	3	62	1
Verlängerung	4 zurück zu 2 (34 Zyklen)	72	2,5
Verlängerung	5	72	10
Ende	6	4	für immer

3.1.9 Plasmidpräparation

In ein 2 ml Eppendorf-Lidbac-Gefäß, welches durch eine luftdurchlässige Membran als Deckel geeignet ist, Bakterien zu kultivieren, wurden 2 ml LB-Medium und 100 μg/ml Ampicillin gegeben. Danach wurden Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und dem Medium zugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C unter Schütteln bei 500 rpm über Nacht. Nun konnte die Plasmidpräparation mittels des *Qiaprep Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden) durchgeführt werden. Die Methode beruht auf einem modifizierten Protokoll von Birnboim und Doly (1979). Falls größere Mengen an Plasmid benötigt wurden, erfolgte eine Inkubation in 300 ml LB-Medium und 100 μg/ml Ampicillin über Nacht. Dieses wurde gemäß Herstellerangaben mit dem *QIAfilter Plasmid Maxi Kits* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Das in Puffer 1

resuspendierte Bakterienpellet wurde in Anwesenheit von RNase A unter alkalischen Bedingungen (Puffer 2: NaOH/SDS) lysiert. Hierbei führt SDS zur Auflösung der Zellmembran, wodurch der Zellinhalt freigesetzt wird. Die chromosomale DNA und Proteine wurden durch die alkalischen Bedingungen denaturiert. Durch die Zugabe von Puffer N3 erfolgte durch Neutralisation und Hochsalzbedingungen eine Präzipitation von SDS und Zelldebris. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand auf die Silikamembransäule aufgetragen. Unter Hochsalzbedingungen erfolgte die Bindung der DNA an die Membran. Mittels Waschpuffer wurden anschließend die Salze entfernt. Die Elution der DNA fand unter Niedrigsalzbedingungen mittels 50 µl destilliertem Wasser (pH 6) statt. Das Eluat konnte nun bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren werden.

3.1.10 Herstellung von *E.-coli*-Dauerkulturen

Die *E.-coli*-Klone wurden über Nacht bei 500 rpm und 37 °C in mit 100 µg/ml Ampicillin versetztem LB-Medium geschüttelt. Anschließend wurden 470 µl der Bakteriensuspension mit 100 µl 87%-igem autoklaviertem Glycerin homogenen vermengt und in einem Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren.

3.1.11 Konzentrationsbestimmung und Reinheit der DNA

Mit Hilfe eines Photometers wurde die Konzentration der DNA durch eine Absorptionsmessung bei 260 nm festgestellt. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm sowie bei 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der DNA. Es sollte >1,8 betragen. Niedrigere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

3.1.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg) durch Zumischung von Didesoxyribonukleotiden nach der Methode von Sanger (Sanger et al., 1977). Hierfür wurde die Plasmid-DNA mit destilliertem Wasser auf 0,1 µg/µl verdünnt und 15 µl davon in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen versandt. Dort ermittelte Sequenzdaten wurden mit den von NCBI veröffentlichten Sequenzen mittels des Programms NCBI Blast verglichen.

3.1.13 Generierung von glatten DNA-Enden mittels Klenow-Polymerase

Das große Klenow-Fragment der DNA Polymerase I (New England Biolabs, Schwalbach) wurde verwendet, um DNA mit *sticky ends*, die durch Restriktionsendonukleasenverdau entstand, in *blunt-ended* DNA zu überführen.

Die Reaktion erfolgte für 15 min bei 25 °C. Die Inaktivierung erfolgte bei 75 °C für 20 min nach Zugabe von EDTA in einer Endkonzentration von 10 mM.

Für die Methode galten in der Tabelle genannte Volumina:

Bestandteile	Volumen
DNA (0,2 µg)	5 µl
dNTP (25 mM)	0,6 µl
Puffer (10x)	1 µl
Klenow-Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
dH ₂ O	ad 10 µl

3.1.14 Induzierbare Expression mit dem Tet-on-Expressionsvektor pRTS

Der Tet-on-Expressionsvektor pRTS-1 (siehe Abbildung 6 c) ermöglicht eine streng regulierte Doxyzyklin-abhängige Kontrolle der Genexpression. Er ist durch eine niedrige Hintergrundaktivität und eine hohe Induzierbarkeit im Beisein von Doxyzyklin gekennzeichnet. Auch ist die Höhe der Induzierbarkeit abhängig von der Doxyzyklin-Konzentration. Das Ein-Vektor-System stellt ein vom Epstein-Barr-Virus (EBV)-abgeleitetes, episomal replizierendes Plasmid dar. Die Selektion in *E. coli* ist durch ein Ampicillin-Resistenzgen gewährleistet. Stabil transfizierte Säuger-Zellen können aufgrund der Anwesenheit des Hygromycin-Resistenzgens, gesteuert durch den SV40-Promotor, selektioniert werden. Die episomale Vermehrung des Plasmids wird durch den episomalen Replikationsursprung des EBV und das EBNA1-Gen gewährleistet. Der β -Aktin-Promoter des Huhns und ein Element aus dem Intron des murinen Schwereketten-Immunglobulins verstärken die konstitutive Expression einer bicistronischen Expressionskassette, welche den Doxyzyklin-sensitiven reversen Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator rtTA2^S-M2 und ein Tetrazyklin-abhängiges Repressions-Fusions-Protein KRAB (tTS^{KRAB}, *silencer*) kodiert.

Die zu untersuchende cDNA (z.B. CEACAM20-cDNA) wird von einem bidirektionalen Promotor abgelesen (P_{tet}bi-1), der eine simultane Expression von zwei cDNAs erlaubt. In der Abwesenheit von Doxyzyklin bindet der *silencer* tTS^{KRAB} an das P_{tet}bi-1

und ermöglicht somit eine massive Herunterregulierung der zu untersuchenden cDNA. Die Zugabe von Doxzyklin hebt diese Repression auf und durch die Bindung von rtTA2^S wird P_{tet}bi-1 aktiviert (Bornkamm et al., 2005).

3.1.14.1 Klonierung der CEACAM20-cDNA in pRTS

Die Klonierung in pRTS erfolgt in zwei Schritten. Um die für die Einfügung der humanen CEACAM20-cDNA in pRTS benötigten CEACAM20-cDNA-flankierenden *Sfi*I-Schnittstellen einzuführen, musste die CEACAM20-cDNA zuerst in den Zwischenvektor pCTWOSFI (Abbildung 6 b) kloniert werden. Hierzu wurde das pcDNA3.0-CEACAM20-Plasmid, das nur konstitutive Expression von CEACAM20 erlaubt (Abbildung 6 a), zunächst mit der Endonuklease *Hind*III geschnitten. Die beim Restriktionsverdau entstandenen *sticky* DNA-Enden wurden mithilfe der Klenow-Polymerase aufgefüllt, was zu *Blunt-end*-DNA führte. Die CEACAM20-cDNA konnte somit nach einem weiteren Restriktionsverdau mit *Xba*I in den *Xba*I/*Eco*RV geschnittenen Zwischenvektor pCTWOSFI kloniert werden. Im nächsten Schritt wurde CEACAM20-cDNA durch *Sfi*I aus pCTWOSFI-CEACAM20 geschnitten und in den *Sfi*I verdauten pRTS kloniert. Die Klonierung von CEACAM20-cDNA erfolgte ungerichtet, da das *insert* über 2 identische *Sfi*I Restriktionsschnittstellen ligiert wurde. Somit entstanden zwei Orientierungen, von denen nur eine der beiden CEACAM20-Expression erlaubte. Durch Doppelverdau der Plasmid-DNA mit *Xho*I und *Hind*III, die jeweils zweimal im Plasmid schnitten, wurde die Orientierung bestimmt. Aufgrund des assymetrischen Schneidens von *Xho*I in der CEACAM20-cDNA konnte anhand der Größen der vier erhaltenen Fragmente die Orientierung der cDNA bestimmt werden (Tabelle 1).

Bei der richtigen Orientierung entstanden vier im Agarosegel sichtbare DNA-Fragmente. Dagegen erkannte man bei der ungewünschten Orientierung nur drei Fragmente. Das vierte Fragment wurde mit einer Größe von 16 bp im Agarosegel nicht mehr sichtbar (Abbildung 7).

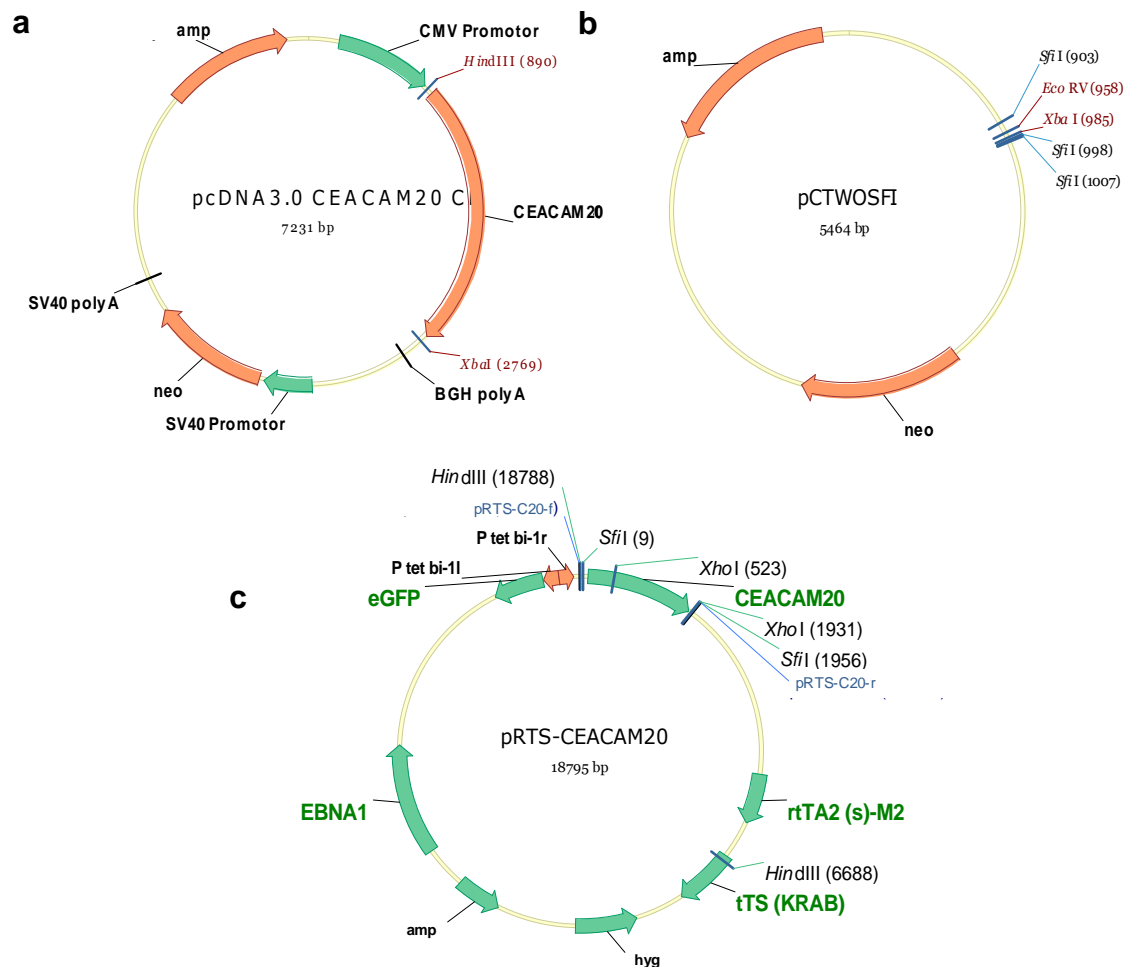


Abbildung 6: Zwischenstufen für die Herstellung von pRTS-CEACAM20 für die Doxzyklin-induzierbare Expression von CEACAM20: pcDNA3.0-CEACAM20-Vektor (a), pCTWOSFI (b), Karte des pRTS-CEACAM20-Vektors mit seinen funktionellen Einheiten (c). CMV, Cytomegalievirus; BGH poly A, *bovine growth hormone* Polyadenylierungssignal; SV40, Simian Virus 40, amp; Ampicillin, neo, neomycin; *SfiI*, *XbaI*, *HindIII*, *EcoRV*-Restriktionsschnittstellen (a). amp; Ampicillin; neo, Neomycin; *SfiI*, *EcoRV*, *XbaI*-Restriktionsschnittstellen (b). In der Übersicht sind nur die für die Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen (*HindIII*, *XhoI*, *SfiI*) und verschiedene funktionelle Einheiten wie eGFP (*enhanced green fluorescent protein*), EBNA1 (Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen 1), sowie die Ampicillin- bzw. Hygromycinresistenz vermittelnden amp (β -Laktamasegen) und hyg (Hygromycin-Phosphotransferasegen) dargestellt. Der bizistronische, durch Tetrazyklin/Doxyzyklin regulierbare Promotor (P tet bi-1r) steuert die Expression von eGFP und CEACAM20. rtTA2(s)-M2 und tTS(KRAB) kodieren Komponenten, die in Abhängigkeit von Tetrazyklin/Doxyzyklin die tet-Promotoraktivierung steuern. Für eine detailliertere Karte des pRTS-Vektors siehe Bornkamm et al. (2005). Die Oligonukleotide pRTS-C20-f und pRTS-C20-r dienen für die Überprüfung der Nukleotidsequenz und für die Einführung von Mutationen als Primer (siehe unten) (c).

Tabelle 1: Größe der je nach Orientierung der zu erwartenden CEACAM20-Fragmente nach Doppelrestriktionsendonukleaseverdau von pRTS-CEACAM20. *HindIII* und *XhoI* sind in pRTS-CEACAM20 jeweils doppelt vorhanden (siehe Abbildung 8).

Fragmente nach Doppelverdau (Position in bp)	Fragmentgröße (bp) gewünschte Orientierung	Fragmentgröße (bp) ungewünschten Orientierung
<i>HindIII</i> (6688)- <i>XhoI</i> (1931)	12100	12100
<i>XhoI</i> (1931)- <i>HindIII</i> (6688)	4757	5280
<i>XhoI</i> (523)- <i>XhoI</i> (1931)	1408	1408
<i>HindIII</i> (18788)- <i>XhoI</i> (523)	530	(16) nicht im Gel sichtbar

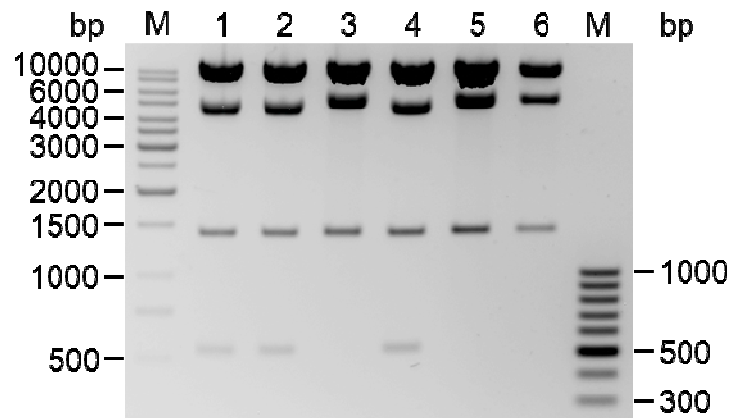


Abbildung 7: Doppelrestriktionsendonukleaseverdau mit *HindIII* und *XhoI* zur Bestimmung der Orientierung der CEACAM20-cDNA im pRTS-Vektor. Die Plasmid-DNA der Kandidatenklone wurde mit *HindIII* und *XhoI* verdaut und durch Elektrophorese in einem 1%-Agarosegel nach der Größe aufgetrennt. Bei Klonen 1, 2 und 4 sind vier Fragmente sichtbar (richtige Orientierung), während sich bei 3, 5 und 6 die ungewünschte Orientierung durch Anwesenheit von drei sichtbaren DNA-Fragmenten zeigt. M, Marker-DNA-Fragmente.

3.1.15 Gezieltes Einführen von Mutationen mittels PCR

Für jede Mutagenese wurden je ein flankierender Forward- und Reversprimer (pRTS-C20-f, pRTS-C20-r; Sequenz siehe Materialteil 2.6) verwendet, welche sich außerhalb der für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen des zu replizierenden *inserts* befinden. Benötigt wurde zudem der komplementäre Forward- und Reversprimer (C20-Y511F-f, C20-Y511F-r, C20-Y536F-f, C20-Y536F-r, C20-Y578F-f, C20-Y578F-r, C20-Y589F-f, C20-Y589F-r, C20-ΔCyt-r; Sequenzen finden sich in Materialteil 2.6), die den zu mutierenden Bereich beinhalten. Sie weisen die gewünschte Basenveränderung möglichst in ihrer Mitte auf. Auf Proteinebene bewirkt diese einzelne Mutation einen Aminosäureaustausch.

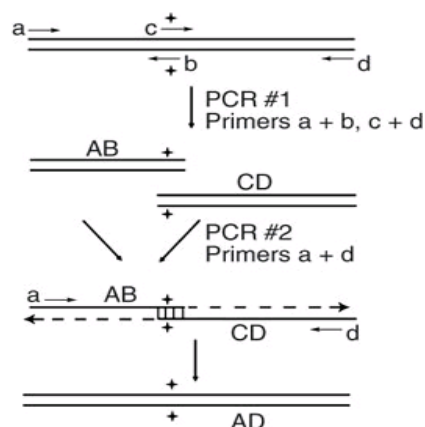


Abbildung 8: Methode der *site-directed mutagenesis*. Flankierender Forwardprimer a, flankierender Reversprimer d, Mutation-beinhaltender Forwardprimer c, Mutation-beinhaltender Reversprimer b. Abbildung aus Heckman und Pease (2007).

Als erstes wurde der flankierende Forwardprimer mit dem im *insert* liegenden Reversprimer mit mittig gelegener Einzelbasen-Mutation in einen PCR-Ansatz gegeben (Abbildung 8 a, b). Als Template diente das pRTS-CEACAM20-Plasmid. Die PCR wurde nach den Bedingungen in den unten aufgeführten Tabellen durchgeführt. Dasselbe Protokoll wurde in einem weiteren Ansatz mit dem flankierenden Reversprimer und dem innerhalb des Templates bindenden, Einzelbasen-mutierten Forwardprimer (c und d) verwendet. Beide Ansätze wurden nun je nach Fragmentlänge durch ein 1-2%-iges Agarosegel aufgereinigt. Die gewünschten Banden wurden ausgeschnitten und mittels *Perfekt Prep Gel Cleanup Kit* (Eppendorf, Hamburg) gereinigt. In einem weiteren Ansatz dienten nun die beiden entstandenen Fragmente AB und CD aus den vorhergehenden PCR-Ansätzen als *template*. Da sie einen komplementären Bereich überlappen, lagern sie sich aneinander und werden durch die Polymerase komplementär ergänzt. Als Primer wurden die flankierenden Forward- und Reversprimer verwendet. Die PCR fand unter gewohnten Bedingungen statt. Es entstand Produkt AD.

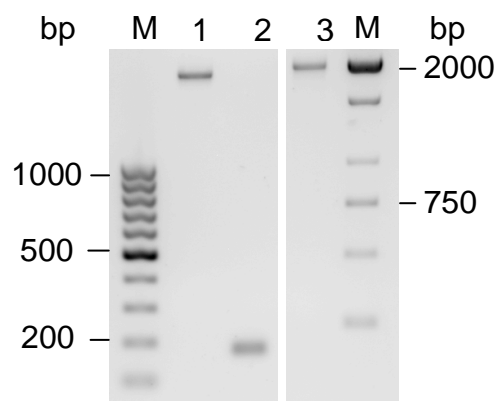


Abbildung 9: Aufreinigung und Größenkontrolle der entstandenen PCR-Produkte der *site-directed mutageneses*. In der Graphik sind die aufgereinigten PCR-Produkte der Vierermutation (4Y -> 4F) zu sehen, stellvertretend für das Vorgehen bei allen Mutationen. Man erkennt das größere Fragment der PCR AB (1), das kleine Fragment der PCR CD (2) und das Produkt der PCR AD (3). M, Marker-DNA-Fragmente.

Die Reaktion wurde nach den Bedingungen der folgenden Tabellen durchgeführt:

Bestandteile	Volumen
Template (0,5 µg/µl)	1 µl
Vorwärts-Primer (10 pg/µl)	2 µl
Rückwärts-Primer (10 pg/µl)	2 µl
PCR-Puffer (10x) mit MgCl ₂	5 µl
dNTPs (25 mM)	5 µl
<i>PfuUltra</i> ® High-Fidelity-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl
dH ₂ O	ad 50 µl

Zyklus	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
Denaturierung	1	95	3
Denaturierung	2	95	1
Primeranlagerung	3	63	1
Verlängerung	4 zurück zu 2 (34 Zyklen)	72	2,5
Verlängerung	5	72	10
Ende	6	4	für immer

Danach erfolgte eine Aufreinigung des Produktes AD mittels *Purification Kit* (Quiagen, Hilden), um die bei der PCR verwendeten Salze, Primer und Nukleotide zu entfernen. Es folgte ein Verdau des entstandenen Fragments mit *SfiI* und anschließend eine Agarosegelaufreinigung. Nun konnte das entstandene *insert* in den *SfiI*-verdauten pRTS-Vektor ligiert und das Plasmid wiederum transformiert werden.

3.1.16 RNA-Isolierung und Qualitätsmessung

Zur Herstellung von RNA aus humanem Gewebe und Karzinomzelllinien wurde das RNeasy®-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet, welches auf der Methode von Chomczynski und Sacchi beruht (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Humanes Gewebe wurde bei -80 °C gelagert und bei -20 °C mit dem Gefriermikrotom (Leica CM3050 S) in 10 µm dicke Scheibchen geschnitten. Zur weiteren Verarbeitung wurden diese mit 1% β-Mercaptoethanol und 600 µl RLT-Puffer (Quiagen, Hilden) versetzt. Entsprechend wurden auch bis zu 5×10^6 Karzinomzellen mit 350 µl RLT-Puffer und 1% β-Mercaptoethanol versetzt. Prinzipiell besteht der RLT-Puffer aus einer Guanidinium-Isothiocyanat-Lösung (GITC), welches das Gewebe oder die Zellen lysiert. GITC ist ein chaotrophes Salz, das Proteine denaturiert und somit auch RNasen inaktiviert. Das Lysat wurde nun auf eine Qiaschredder®-Säule geladen und bei 16.100x g für 2 min zentrifugiert. Durch Zugabe von 70%-igem Ethanol wurden geeignete Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silicagel-Membran geschaffen. Nach einem Zentrifugationsschritt (16.100x g) konnten nun die Kontaminanten mit den mitgelieferten Puffern (RW1, RPE) ausgewaschen werden. Anschließend konnte die RNA durch RNase-freies Wasser eluiert werden. Durch eine photometrische Absorptionsmessung bei 260 nm konnte die RNA-Konzentration des Eluats gemessen und bei -80 °C bis zur weiteren

Verwendung gelagert werden. Für die Qualitätsmessung wurde die isolierte RNA mittels Agilent Bioanalyzer 2100 mit dem RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) nach Herstellerangaben analysiert. Hierbei wurde eine Kapillarelektrophorese in Gegenwart des mit RNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff Cy-3 ausgeführt. Aufgetrennte RNA-Spezies wurden durch Fluoreszenzmessung detektiert. Die Fluoreszenz wird durch Laserstrahlung induziert (Mueller et al., 2000). Die Messungen werden mit der „Software 2100 Expert“ im „Eukaryote Total RNA Pico Assay Modus“ ausgewertet. Basierend auf dem Mengenverhältnis der 28 S- und 18 S-rRNA, das bei intakter Gesamt-RNA 2:1, beträgt und einem molaren Verhältnis von 1:1 entspricht, wird dabei eine sogenannte *RNA Integrity Number* (RIN) errechnet (Schroeder et al., 2006). Diese kann optimal den Wert 10 annehmen. Für diese Arbeit wurde nur RNAs mit RIN-Werten $\geq 7,0$ verwendet.

3.1.17 Reverse Transkription von RNA

Durch die Reverse-Transkriptase-PCR wird die bereits isolierte RNA in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Die für die Reaktion benötigten Komponenten wurden von der Firma Promega (Madison, USA) verwendet. Die Methode beruht auf der Fähigkeit der aus dem *Avian-Myeloblastosis-Virus* isolierten reversen Transkriptase die gesamte zelluläre mRNA in einer so genannten Erststrangreaktion in einzelsträngige cDNA umzuschreiben. Als Primer dienten Desoxyribonukleotid-Hexamere (*random hexamer primers*), die aus zufälligen Sequenzkombinationen bestehen und sich somit jeder beliebigen Matritze anlagern können. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurde 1 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und für 10 min bei 70 °C denaturiert (Schritt 1). Die weitere Vorgehensweise ist in den folgenden beiden Tabellen zusammengefasst:

Komponenten	Volumen
RNA-Matrize (1 µg) + RNase-freies H ₂ O	10 µl
<i>Random Primers</i> (0,5 µg/µl)	1 µl
RT-Puffer (10x)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
AMV-Reverse-Transkriptase (25 U/µl)	0,6 µl
RNase-Inhibitor (RNasin) (40 U/µl)	0,6 µl
dH ₂ O	ad 20 µl

Zyklus	Schritt	Temperatur in °C	Zeit in min
Primeranlagerung	2	25	10
Verlängerung	3	42	60
Denaturierung	4	95	5

Anschließend wurde die erhaltene cDNA für weitere Versuche in einem Verhältnis von 1:5 mit dH₂O verdünnt.

3.1.18 Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die *real-time*-PCR diente zur quantitativen Messung der erhaltenen cDNA mithilfe des Light-Cycler®-Systems (Roche, Mannheim). Verwendet wurde hierfür das Light-Cycler® FastStart DNA Master^{Plus} Sybr Green I-Kit (Roche, Mannheim). Nach Angaben des Herstellers wurden 16 µl Mastermix und 4 µl verdünnte cDNA in eine Glaskapillare gegeben. Nur bei Bindung von Sybr Green I an doppelsträngige DNA (dsDNA) beginnt der Farbstoff zu fluoreszieren. Der sogenannte *crossing point* (Cp) wird bei Erreichen eines bestimmten, vom Analyseprogramm vordefinierten Fluoreszenzwerts ausgelesen. Er korreliert mit der Anfangskonzentration der eingesetzten cDNA. Somit wurde eine Quantifizierung der Transkripte ermöglicht. Im Anschluss an den letzten Elongationsschritt der PCR erfolgte eine Schmelzkurven-Analyse, bei der der Schmelzpunkt der PCR-Produkte bestimmt wird. Jedes der PCR-Produkte besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur. Eine einheitliche Schmelztemperatur der jeweiligen PCR-Produkte spricht für die Spezifität der Amplifikation. Durch das Computerprogramm Light-Cycler 3 (Version 5.32) konnte der Versuch sowohl durchgeführt als auch ausgewertet werden. Die Berechnung der relativen, für die β -Aktin-mRNA-Menge korrigierten CEACAM20-mRNA-Menge wurde mithilfe der Formel $2^{Cp_{Aktin} - Cp_{CEACAM20}}$ berechnet.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Die verwendete Zelllinie HEK239T wurden in einem humidifizierten Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Begasung in Kulturflaschen oder -platten mit Standard-Medium (RPMI, 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % MEM nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA), 1 % Na-Pyruvat, 1 % Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Abhängig von der

Wachstumsgeschwindigkeit wurden die semi-adhärenenten Zellen alle 3-4 Tage passagiert. Hierbei wurde zunächst das verbrauchte Medium abgesaugt. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin/EDTA von der Oberfläche abgelöst (3 min Inkubation bei 37 °C). Inaktivierung der enzymatischen Reaktion erfolgte durch Zugabe frischen Mediums. Die Zellsuspension wurde bei 340x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun erfolgte die Resuspension des Zellpellets in Medium. Die Neubauer-Zählkammer diente der Bestimmung der Zellzahl. Anschließend wurden 1×10^6 Zellen neu angesetzt.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Um tote Zellen zu identifizieren, wurde zur Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:1 Trypanblaulösung zugegeben. Tote Zellen können aufgrund einer perforierten Zellmembran den Farbstoff aufnehmen. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellzahl pro ml Suspension ergab sich aus dem Produkt der mittleren Zellzahl pro Großquadrat, dem Verdünnungsfaktor und der Zahl 10^4 .

3.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zum Auftauen wurden die Zellen dem Stickstofftank entnommen und in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Sobald sich die eingefrorene Zellsuspension verflüssigt hatte, erfolgte sofort eine Verdünnung mit 10 ml 37 °C warmen Mediums in einem 15-ml-Falcon-Röhrchen. Zentrifugiert wurde bei Raumtemperatur für 5 min bei 340x g. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml neuem Medium resuspendiert und in eine 75 cm² große Kulturflasche gegeben.

Beim Einfrieren wurden 5×10^6 Zellen in 0,8 ml eines speziellen Einfriermediums (10% DMSO, 20% FCS) steril eingefroren. Hierzu wurden die Zellen bei Raumtemperatur und 340x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet im Einfriermedium resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren. Nach einem Tag wurde das Kryoröhrchen in die Stickstofftonne überführt.

3.2.4 Transiente Transfektion von Kulturzellen

Die transiente Transfektion diente dazu, ein gewünschtes Protein durch Einbringen des Expressionsvektors in HEK293T exprimieren zu können. Dazu wurde das Transfektionsagens Fugene-HD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Es wurden 5×10^5 Zellen pro *well* in einer 6-*well*-Platte über Nacht inkubiert. Pro *well* wurde nun ein Transfektionsansatz aus 97 μ l serumfreien Mediums und 3 μ l Fugene-HD mit 1 μ g DNA zugegeben und für 6 h inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel, um das Transfektionsagens zu entfernen. Zur Induktion von CEACAM20 wurden 1 μ g/ml Doxzyklin für 48 h hinzugefügt.

3.2.5 Stabile Transfektion von Kulturzellen

Um einen eventuellen Einfluss des CEACAM20 auf das Wachstumsverhalten von Kulturzellen zu untersuchen, wurden Karzinomzellen mit pRTS-CEACAM20 stabil transfeziert. Es wurden 5×10^5 Zellen pro *well* in einer 6-*well*-Platte über Nacht inkubiert. Unter Verwendung von FuGene HD-Reagenz wurden bei der Lipofektion ein Ansatz aus 97 μ l serumfreien Mediums, 6 μ l Fugene-Reagenz und 2 μ g DNA pro *well* zugegeben. 24 h später wurden die Zellen in Kulturschalen, mit 7 cm Durchmesser umgesetzt. Dies diente dazu, die Zellen 1:5 zu verdünnen, damit sie für die später geplante Selektion nicht zu konfluent wurden. Die Selektion wurde einen Tag später durch Zugabe von Hygromycin begonnen. Bei den HEK293T wurde Hygromycin in einer Konzentration von 100 μ g/ml über zwei Wochen zugegeben. Danach wurde die Konzentration halbiert und nach einer weiteren Woche wurden einzelne Zellkolonien sichtbar. Die Kolonien der semi-adhären HEK293T-Zellen konnten durch Auf- und Abpipettieren mit 10 μ l Volumen von der Platte abgelöst werden und wurden in eine 24-*well*-Platte übertragen. Die Zelllinien wurden bei etwa 80% Konfluenz in eine 6-*well*-Platte übertragen und dann wiederum bei selbiger Konfluenz in eine kleine Kulturflasche übertragen. Nach Umsetzen der Zellen durfte frühestens nach 6 h wieder mit der Selektion mit 100 μ g/ml Hygromycin begonnen werden. Hierfür sollten die Zellen bereits adhären sein, denn aufgrund von Beobachtungen kann Hygromycin das Anheften der Zellen verzögern oder sogar verhindern.

3.2.6 Pervanadat-Behandlung von Kulturzellen

Zunächst wurde eine transiente Transfektion (Kapitel 3.2.4) mit dem Tet-on-Expressionsvektor durchgeführt. Nach 6 h wurde das Medium gewechselt und durch Zugabe von 1 µg/ml Doxzyklin für 48 h CEACAM20-Expression induziert. Anschließend wurde mit der Pervanadat-Behandlung begonnen. Diese Substanz ist ein Tyrosinphosphatase-Inhibitor, wodurch es das Gleichgewicht zwischen Kinasen und Phosphatasen zugunsten der Kinasen verschoben wird. Somit kann die Phosphorylierbarkeit von Proteinen gezeigt werden. Bei jeder Behandlung wurde Pervanadat neu angesetzt. In 2 ml H₂O wurden 18 mg Natriumorthovanadat zugegeben. Aus dieser Vanadat-Lösung wurden nun 0,5 ml entnommen und mit 7,6 ml H₂O und 1,9 ml 30% H₂O₂ versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um Pervanadat zu erhalten. In kleine Kulturflaschen wurden zu 5 ml frischem Serum-freiem Medium 100 µl Pervanadatlösung zugefügt und für 10 min im Inkubator bei 37 °C temperiert. Die Zellen wurden dann auf Eis gestellt und konnten aufgrund ihrer Semiadhärenz mit einer Pipette leicht von der Kulturflasche gelöst werden. Nach Zentrifugation für 3 min bei 340x g wurden die Zellen erst in Pervanadat versetztem Medium und anschließend mit Vanadat versetztem Medium (100 ml Medium, 2 ml Vanadat-Lösung) gewaschen. Nach Überführung der Zellen in ein 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen konnte mit der Lyse der Zellen begonnen werden (Kapitel 3.2.8).

3.2.7 Lyse der Zellen

Die Zellen wurden vor der Lyse zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend gezählt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert. Die Zellzahl bestimmte, wie viel Volumen an Lysepuffer (20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 1% Nonidet NP-40, 50 mM NaF, 1 mM Na-Orthovanadat, Protease-Inhibitoren Cocktail Tablette *complete mini* (Roche Diagnostics, Mannheim)) zugegeben wurde. Die Lyse erfolgte für 5 min auf Eis. Unterstützend wurde ein eisgekühltes Ultraschallbad eingesetzt. Zuletzt wurde das Eppendorf-Gefäß bei 4 °C bei 16.100x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand mit dem Zelllysate wurde in einem neuen Gefäß bei -80 °C eingefroren.

3.2.8 Proteinbestimmung

Zunächst wurden in einer 96-well-Rundbodenplatte 250 µl/well einer BSA-Verdünnungsreihe von 2 µg/µl bis 0,125 µg/µl (*Quick Start™ Bradford Protein Assay*, Bio-Rad, München) pipettiert, um eine Eichkurve zu erstellen. Die zu bestimmenden Protein-haltigen Proben wurden 1:10 mit dH₂O verdünnt. Um einen Mittelwert zu erhalten wurden die Proben und die Verdünnungsreihe doppelt aufgetragen. Nun wurde jedes well mit 250 µl *Quick Start™ Bradford Dye Reagent* (Bio-Rad, München) versetzt und im Schüttler 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Proben im FLUOstar Optima (BMG Labtech, Offenburg) mit der Software OPTIMA-Control gemessen.

3.2.9 Erstellung einer Wachstumskurve von stabil transfizierten Kulturzellen

Pro well wurden in einer 6-well-Platte 1×10^5 stabile CEACAM20-Transfektanten und nicht transfizierte Mutterzellen in 2 ml Medium im Brutschrank kultiviert. Als Selektionsagens wurde Hygromycin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Nachdem die Zellen nach circa 6h adhärent waren, wurde Doxyzyklin in einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben. Verglichen wurden Zellen, die unter Induktion mit Doxyzyklin standen und nicht induzierte Zellen desselben Zellklons. Täglich erfolgte eine Zählung der lebenden, Trypanblau-ausschließenden Zellen.

3.2.10 Zell-Vitalitätsassay

Der *CellTiter-Blue®* Assay (Promega, Mannheim) diente zur Überprüfung der Vitalität und Proliferation von Zellen. Als Indikatorreagenz fungierte Resazurin, welches von vitalen Zellen in Resorufin umgewandelt wird. Letzteres besitzt eine hohe Fluoreszenz. Nicht-vitale Zellen verlieren diese metabolische Fähigkeit. Somit kann das Indikatorreagenz nicht mehr umgewandelt werden und es entsteht kein erhöhtes Fluoreszenzsignal. Das gemessene Fluoreszenzsignal steht in linearem Zusammenhang mit der Zellzahl und spiegelt auch die Vitalität der Zellen wieder.

Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen am Tag vor Versuchsbeginn gezählt und in farblose 96-well-Flachbodenplatten verteilt. Die Kultivierung erfolgte nun mit 100 µl

farblosem Medium (RPML, 10 % FCS, 5% Penicillin/Streptomycin/Glutamin, 5%, MEM NEAA, 5% Pyruvat, 20 mM HEPES (GIBCO BRL, Karlsruhe)). Das farblose Medium diente dazu, bei der Fluoreszenzmessung das Fluoreszenzsignal nicht zu beeinflussen. HEPES wurde im Zellkulturmedium als pH-Stabilisator verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden einer speziellen für die Zellkultur ausgerichteten Metallbox im Brutschrank untergebracht, um die erhöhte Verdunstung des Mediums in den Rand-wells der *Multi-well*-Zellkulturplatte zu verhindern.

Die Zugabe von verschiedenen Doxyzyklin-Konzentrationen (1000, 500, 250, 125, 60, 30, 15, 7.5, 3.25, 1.5, 0 ng/µl) erfolgte 6 h nach der Ausplattierung der Zellen. Im Versuch wurden immer jeweils 4 wells komplett gleich behandelt, um später einen Mittelwert errechnen zu können. Je nach Versuchsaufbau wurden nun die Zellen 2 h bis zu 8 Tagen in Gegenwart von Doxyzyklin gezüchtet. Das Indikatorreagenz wurde 1 h vor Fluoreszenzmessung zugegeben. Dieses wurde hierbei 1:5 mit farblosen Medium verdünnt, wovon 100 µl in jedes well gegeben wurden. Die Mikrotiterplatte wurde mit Alufolie abgedeckt, da das Reagenzgemisch lichtempfindlich ist. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank. Die Fluoreszenzmessung wurde mit dem FLUOstar Optima *microplate reader* (BMG Labtech, Offenburg) gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse fand mit Hilfe einer *Microsoft Excel-Tabelle* statt.

3.2.11 Herstellung von Zytospins

Stabile Transfektanten wurden 48 h mit 1 µg/µl Doxyzyklin behandelt, die Vergleichsgruppe blieb ohne Doxyzyklinzusatz. Danach wurden die Zellen trypsiniert, 2x mit PBS gewaschen und gezählt. Für jeden Objektträger wurden 4×10^4 Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und mittels der Shandon-Zentrifuge (Thermo, Langsenbold) bei 1000 rpm für 5 min auf den Objektträger transferiert. Die Zytospins wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur immunhistologischen Färbung bei -20 °C eingefroren.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Immunhistologie

Um CEACAM20 in Ovarial- und Magenkarzinomgewebe zu erkennen, wurde einerseits der monoklonalen murine Anti-human CEACAM20-Antikörper 6G4A5 (Aldevron/Genovac, Freiburg) und ein polyklonales Anti-human CEACAM20-Mausserum (hergestellt von Andreas Eisenried) verwendet. Als Negativkontrolle diente der monoklonale MOPC-Antikörper (Sigma, Taufkirchen). Für das polyklonale Anti-CEACAM20-Mausserum fungierte das zugehörige Präimmunserum als Negativkontrolle. Die Paraffin eingebetteten Gewebeproben, wurden freundlicherweise von Dr. Christoph Weiler, Pathologisches Institut der LMU zur Verfügung gestellt. Weiterhin wurden selbst hergestellte Zytospins mit dem Färbeprotokoll für Kryoschnitte gefärbt.

Die Paraffinschnitte wurden zuerst mit 300 ml Rotihistol® (Roth, Karlsruhe) entparaffiniert und danach mit je 300 ml einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 75% Ethanol) mit abschließendem Bad in 300 ml destilliertem Wasser wieder rehydratisiert. Danach wurden die Gewebeschnitte in 150 ml einer *Retrieval*-Lösung (Tris/EDTA, pH 9,0; Target Retrieval Solution, DakoCytomation, Glostrup Denmark) 30 min in der Mikrowelle auf rund 95 °C erhitzt. Dies diente dazu, die Epitope für die spätere Antikörper-Bindung wieder zugänglich zu machen. Nun folgten drei Waschschriffe mit jeweils 150 ml PBS und sowie Blockierung endogener Peroxidase für 5 min mit 150 ml Blockierungslösung (80 ml PBS, 10 ml Methanol und 10 ml 30% H₂O₂). Nach dreimaligem Waschen in 150 ml PBS und Blockierung mit 100 µl 2,5% Pferdeserum (ImmPRESS®, Vector, Burlingame, USA) begann die Inkubation mit 100 µl Erstantikörper (6G4A5 20-50 µg/µl, Negativkontrolle MOPC 10 µg/µl, das Präimmunserum bzw. Mausserum in 1:100 Verdünnung) in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C. Darauf folgten drei Waschschriffe mit 150 ml PBS und eine dreißigminütige Inkubation mit 100 µl des Zweitantikörpers (ImmPRESS®, Vector, Burlingame, USA). Die Gewebeschnitte wurden wiederum 3x in 150 ml PBS gewaschen, für 15 min in 200 ml Färbelösung bestehend aus 16 ml 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC; 64 mg AEC in 16 ml Dimethylformamid) und 184 ml Acetat-Puffer, pH 5,2 (10,75 g Na-Acetat·3H₂O, 1,21 ml Essigsäure ad 1 L) mit 240 µl 30% (w/v) H₂O₂) inkubiert und für 30 s mit 50 µl Hämalan-Lösung (Mayers Hämalanlösung, Merck, Darmstadt) gegengefärbt. Die auf dem Objektträger

verbleibenden Farbreste wurden mit 500 ml Leitungswasser ausgewaschen. Zuletzt wurden die Gewebeschnitte mit 2 Tropfen Aquatex® (Merck, Darmstadt) eingedeckelt und konnten nach 2 h Trockenzeit unter dem Mikroskop (Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35; Zeiss, München) analysiert werden.

Die Zytospins wurden zunächst 5 min in Aceton (Merck, Darmstadt) fixiert. Es folgten drei PBS-Waschschritte und Blockierung der endogenen Peroxidase wie oben beschrieben für 5 min. Nach drei Waschritten mit PBS erfolgte eine Blockierung mit 100 µl 2,5% Pferdeserum (ImPRESS®, Vector, Burlingame, USA). Der Erstantikörper (6G4A5 20-50 µg/µl, Negativkontrolle MOPC 10 µg/µl, das Präimmunserum bzw. Mausserum in 1:100 Verdünnung, jeweils 100 µl) wurden in einer feuchten Kammer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde dreimal mit 200 ml PBS gewaschen und es folgte die Inkubation für 1 h mit 100 µl des Zweitantikörpers (ImmPRESS®, Vector, Burlingame, USA), welcher HRP gekoppelt ist. Nachdem weitere PBS-Waschschritte mit einem Volumen von 200 ml durchgeführt wurden, schloss sich wie oben beschrieben die Peroxidasefärbung mit 200 ml Färbelösung für 15 min und die Gegenfärbung mit 100 µl Hämalaun (Mayers Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt) für 30 s an. Nun wurden die Zytospins mit 2 Tropfen Aquatex® (Merck, Darmstadt) beträufelt und mit Deckgläsern versehen.

3.3.2 Zellbasierter ELISA (CELISA)

Der *cell-based enzyme-linked immunoabsorbent assay* (CELISA) diente zur Testung von stabil transfizierten Zellen auf Erhalt und Induzierbarkeit des Tet-on-Expressionsvektors mit Doxyzyklin.

Zunächst wurden 8.000 Zellen pro *well* in einer 96-*well*-Zellkulturplatte über Nacht kultiviert. Für jeden Zellklon wurden hierbei jeweils 8 *wells* verwendet. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Mutterzellen (HEK293T-Zellen), als Positivkontrolle CEACAM20-exprimierende COS-7-Zellen (erhalten von Michaela Paptistella). Anschließend erfolgte eine Zugabe von 1 µg/ml Doxyzyklin in 4 der 8 *wells* eines Zellklons. Nach 48 h wurde das Kulturmedium entfernt und mit 250 µl PBS/1% BSA-Lösung für 1 h im Inkubator blockiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 2 min bei 2.000x g wurde das Medium entfernt. Es wurden 50 µl PBS/1% BSA mit einer 1:200 Verdünnung des monoklonalen Anti-CEACAM20-Antikörpers 6G4A5 (10 µg/ml) zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h.

Anschließend wurde erneut zentrifugiert und es folgte ein Waschschrift. Nun wurden 50 µl PBS/1% BSA mit einem 1:5.000 verdünnten HRP-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper pro *well* verteilt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt und fünf Waschschriffe mit PBS, zwischen welchen jeweils zentrifugiert wurde. Zuletzt wurden die Zellen mit 50 µl Amplex® Red Reagenz (MoBiTec, Göttingen) inkubiert. Die immer frisch angesetzte Lösung bestand aus 10 ml Amplex® Red-Reaktionspuffer, 50 µl 20 mM H₂O₂ und 25 µl einer 10 mM Amplex®-Red-Lösung. Die Inkubationszeit betrug 1 h im Dunkeln. Die Zellen wurden nun in eine 96-*well*-Platte aus schwarzem Polypropylen umgesetzt. Dies dient dazu, Streulicht in der Fluoreszenzmessung durch den FLUOstar Optima *microplate reader* (BMG Labtech, Offenburg) zu vermeiden.

3.3.3 Durchflussszytometrie

In der Durchflussszytometrie werden verschiedene Parameter von Zellen, wie beispielsweise Granularität und Größe, aufgrund ihres Streuvermögens von Laserlicht gemessen. Außerdem können gezielt Antigene auf der Zelloberfläche mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern durch Fluoreszenzmessung detektiert werden. Die Stärke der Fluoreszenz ist direkt proportional zur gebundenen Antikörpermenge und spiegelt somit die Antigenmenge wieder, welche eine Zelle an ihrer Oberfläche exprimiert.

Zur Versuchsvorbereitung wurde jeder Zellklon auf zwei Kulturflaschen verteilt. Jeweils eine Kulturflasche eines Zellklons wurde für 48 h mit 1 µg/ml Doxyzyklin versehen, während die zweite entsprechende Kulturflasche mit unverändertem Zellkulturmedium versorgt wurde. Somit wurde später in der Messung ein Vergleich von induziertem und nicht induziertem Zustand möglich. Nach zwei Tagen wurden nun jeweils 5x10⁵ Zellen pro nicht induziertem und induziertem Zellklon in ein Eppendorfgefäß überführt und zweimal mit FACS-Puffer (PBS, 1% Na-Azid, 1% BSA) gewaschen; zentrifugiert wurde 3 min bei 340x g. Nach Entfernung des Überstandes wurde auf jede Probe 50 µl Primärantikörperlösung (CEACAM20-Antikörper, 6G4A5) in FACS-Puffer mit einer Konzentration von 80 µg/ml gegeben, gut vermischt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit FACS-Puffer, wie oben beschrieben, gewaschen. Anschließend wurden 20 µl Fluoresceinisothiocyanat (FITC)- oder Phycoerytrin (PE)-gekoppelte

Sekundärantikörper in einer Konzentration von 20 µg/ml zugegeben. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 30 min bei 4 °C. Nach drei Waschschritten wurde das Zellpellet in 300 µl FACS-Puffer (0,1 g bovines Serumalbumin, 50 ml PBS) aufgenommen und in beschriftete FACS-Röhrchen überführt. Zur Markierung toter Zellen wurde zuletzt 100 µl Propidiumjodidlösung (10 µg/µl Stammlösung mit PBS 1:250 verdünnt) hinzu pipettiert. Gemessen wurde im Durchflusszytometer bei einer Flussrate von maximal 1.000 Zellen/s. Die Auswertung erfolgte mit der BD CellQuest Pro™ Software.

3.3.4 Immunpräzipitation

Durch die Immunpräzipitation kann ein gewünschtes Antigen und eventuell daran gebundene Partner mittels eines spezifischen Antikörpers aus Proteinlysaten, beispielsweise von transient transfizierten Kulturzellen (Kapitel 3.2.4), angereichert werden. Dieses wird anschließend im *Western blot* (Kapitel 3.3.6) mit Hilfe eines weiteren oder desselben spezifischen Antikörpers detektiert oder durch eine Gelaufftrennung für die Massenspektrometrie (Kapitel 3.3.7) vorbereitet.

Die Immunpräzipitation wurde mit an Protein-G-Sepharose®-Kügelchen (Sigma, Taufkirchen) gebundenen Antikörpern durchgeführt. Protein-G-Sepharose® hat die Eigenschaft Fc-Bereiche von IgG-Antikörpern an sich zu binden. Zunächst wurden die Sepharosekügelchen fünfmal mit eiskaltem Lysepuffer 1 (20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1% Nonidet NP-40, 50 mM NaF) gewaschen und für 15 s bei 10.000x g zentrifugiert. Die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper erfolgte für 1 h bei 4 °C unter Rotation. Drei weitere Zentrifugations- und Waschschrritte mit Lysepuffer 2 (20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1% Nonidet NP-40, 50 mM NaF, 1 mM Na-Orthovanadat, Protease-Inhibitor Tablette *complete mini* (Roche Diagnostics, Mannheim) folgten. Nach entfernen des Überstandes wurden 40 µl der Protein-G-Sepharose®-Suspension und 100 µg Protein mit PBS auf 0,5-1,0 µg/µl verdünnt. Die Inkubation erfolgte rotierend über Nacht bei 4 °C im Rotator. Die mit den Proteinproben inkubierte Protein-G-Sepharose®-Suspension wurde erneut mit Lysepuffer 2 gewaschen. Bis zur weiteren Analyse durch den *Western blot* (Kapitel 3.3.6) konnten die Proben bei -80 °C eingefroren werden.

3.3.5 Auftrennung von Proteinproben im Gradientengel

Die stabilen Transfektanten wurden 48 h mit Doxzyklin (1 µg/ml) induziert. Wie bereits in Kapitel 3.2.7 beschrieben wurden die Zellen danach lysiert und bei Bedarf Proteine immunpräzipitiert (Kapitel 3.3.4).

Die Proteinproben wurden nach folgendem Schema vorbereitet:

Komponente	Volumen
Proteinprobe	20 µg
Dithiothreitol (DTT)	2 µl
Auftragspuffer (NuPAGE® LDS <i>sample buffer</i>)	5 µl
dH ₂ O	ad 20 µl

Hierbei erreichte man durch Zugabe von DTT die reduktive Spaltung von Cystinbrücken und verhinderte die Oxidation von Cystein-Sulfhydrylgruppen (-SH) zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff. Der Auftragspuffer bewirkte, dass die Probe bis an den Boden der Geltasche absank.

Die Komponenten wurden mit Hilfe des Vortex vermischt, bei 95 °C für 5 min erhitzt und abzentrifugiert. Nun konnten die Proben in einem Gradientengel (4-12% Bis-Tris-Gel, Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen werden. Der Marker (*Precision Plus Protein Dual Color Standards*, Bio-Rad, München) wurde immer zum Größenvergleich mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte 30 min bei 90 Volt und 2 h bei 120 Volt. Anschließend konnte das Gradientengel für den *Western blot* weiterverwendet werden oder für die Massenspektrometrie vorbereitet werden.

3.3.6 Proteinanalyse im *Western blot*

Der *Western blot* diente zur Proteinanalyse von Immunpräzipitaten aus transient transfizierten Zellen oder stabilen Transfektanten.

Das Blotten erfolgte auf eine Membran (Hybond™-P, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) und wurde 1 h bei 200 mA durchgeführt. Der Aufbau des Blottes ist in Abbildung 10 gezeigt.

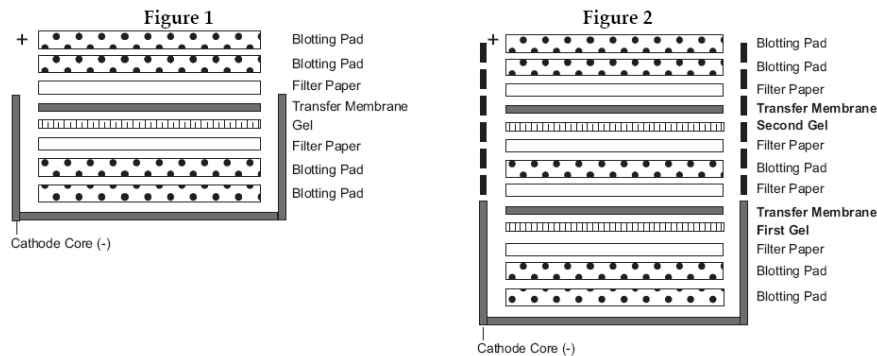


Abbildung 10: Schemata für den Aufbau des Blottes zum Proteintransfer aus Polyacrylamidgelen mit einem (links) und zwei (rechts) Gelen.

Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in Blotmilch (500 ml 1x PBS, 25 mg Milchpulver, 500 µl Tween20) geblockt. Am folgenden Tag wurde die Membran in 5 ml Blotmilch gegeben, welche den Primärantikörper in einer Konzentration von 20 µg/ml enthielt. Es wurde 2 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgten drei Waschrhythmen für 10 min mittels Blotmilch auf dem Schüttler (Certomat® H). Anschließend folgte die Inkubation mit einem Peroxidasegekoppelten Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:3.000 mit Blotmilch für 1 h bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren Waschrhythmen und Spülung der Membran mit PBS/0,1% Tween wurde sie mit 1 ml *ECL™ Western Blotting Detection Reagents* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) für 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. In einer *Hypercassette™* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) wurde die Belichtung der Filme (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) in der Dunkelkammer für 1-50 min durchgeführt. Die Entwicklung der Filme erfolgte im Röntgenentwicklungsgerät Scopix LR5200 (Agfa, München).

3.3.7 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

Diese Methode wurde in Zusammenarbeit mit Dr. J. Shively und H. Zhang im *Beckman Research Institute, City of Hope* durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteinproben mit Hilfe eines Gradientengels (Kapitel 3.3.5) wurde das Gel aus der Plastikverankerung gelöst und über Nacht mit *Coomassie Brilliant Blue* (Pierce, Rockford, Illinois) gefärbt. Die einzelnen Spuren des Elektrophoresegels wurden in 30 ähnlich große, horizontale Stücke geteilt, in Laufrichtung durchnummeriert (1-30, von

hohem nach geringerem Molekulargewicht) und in Eppendorf Röhrchen verteilt. Nun folgte die Probearbeitung für die Massenspektrometrie.

Folgende Lösungen wurden hierzu benötigt:

Nativpuffer: 29 g Tris Base (Merck, Darmstadt), 144 g Glycin (Sigma, Taufkirchen) in 1 l destiliertem Wasser .

Waschlösung: 50 mM Ammoniumbikarbonat-Lösung (ABK) (Sigma, Taufkirchen).

Reduzierende Lösung: 10 mM Tris(2-Carboxyethyl)-Phosphin-Hydrochlorid (TCEP-HCl; Pierce, Rockford, Illinois); 100 mM TCEP wurden dazu 1:10 mit 100 mM ABK verdünnt.

Alkylierende Lösung: 50 mM Iodacetamid (IAM; Sigma, Taufkirchen) in 100 mM ABK; im Dunkeln bei -25 °C aufbewahrt.

Trypsin-Stammlösung: 5 µl of 1 µg/µl Trypsin in 10 mM HCl, gelagert bei -25 °C.

Alle selbst hergestellten Lösungen wurden durch einen sterilen 0.22-µm-Spritzenvorsatzfilter (Millipore, Billerica, Massachusetts) gepresst, um Kontaminationen aus Staub und Schuppen (Keratin) zu entfernen. Es wurden 100 µl 45% (v/v) Acetonitril (CH_3CN ; Merck, Darmstadt)/55% (v/v) 100 mM ABK in jedes Röhrchen gegeben und bei 4 °C auf einem Schüttler (Certomat® H) über Nacht inkubiert. Nach Verwerfen des Überstandes folgten die Reduzierungsschritte. 100 µl CH_3CN wurden für 10 min hinzugefügt und danach abpipetiert. Das Gelstück sollte schrumpfen und sich weißlich verfärben. Dann wurden 1 µl der reduzierenden Lösung zugefügt, für 30 min bei 37 °C inkubiert und die Flüssigkeit abpipetiert. Nun wurden 20 µl der alkylierenden Lösung zugefügt (Inkubationszeit: 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln). Nach Verwerfen des Überstands folgten Waschschriffe zunächst mit 100 µl CH_3CN , dann mit 10 µl Waschlösung und zuletzt mit 100 µl CH_3CN . Bei jedem der Schritte betrug die Inkubationszeit 10 min bei Raumtemperatur, nach welcher der Überstand vollständig entfernt wurde. Zuletzt trocknete das offene Eppendorfröhrchen für 5 min an der Luft in einer sterilen Werkbank. Ein 5-µl-Aliquot der Trypsin-Stammlösung (1 µg/µl) wurde durch Zugabe von 50 mM ABK auf 10 ng/µl verdünnt. 20 µl der hergestellten Lösung wurden in jedes Röhrchen hineingegeben. Sobald das Gel maximal viel Flüssigkeit aufgenommen hatte, konnte die verbleibende Flüssigkeit entfernt werden. Es wurden nun 15 µl Waschlösung zugefügt und bei 37°C im Dunkeln über Nacht inkubiert. Nun

wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Röhrchen übertragen und konnte nun mit Hilfe von *liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry* (LC/MS/MS) untersucht werden.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsorte von CEACAM20

Eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der Funktion eines Gens ist die Kenntnis seines Expressionsmusters. Weiterhin werden für funktionelle Untersuchungen des interessierenden Gens exprimierende Zelllinien benötigt. Durch Vorarbeiten war bekannt, dass Dünndarm- und Hodennormalgewebe, als auch Prostatanormal- und Prostatakarzinomgewebe CEACAM20 exprimieren. Ob CEACAM20 in weiteren epithelialen Tumoren oder auch in Geschlechtsdrüsen vertreten ist, sollte in den folgenden Experimenten geklärt werden. Zebhauser et al. (2005) konnten murine Ceacam20-mRNA in Magenkarzinomgewebe, nicht jedoch in Magennormalgewebe der Maus nachweisen. Murine Ceacam20-Transkripte wurden sowohl in der männlichen Geschlechtsdrüse Prostata als auch im Ovar (*NCBI Geo Profiles*) detektiert. Durch Bestimmung der CEACAM20-Expression auf mRNA-Ebene und Proteinebene sollte geklärt werden inwiefern diese Gegebenheiten auch auf den Menschen zutreffen.

4.1.1 Expression von CEACAM20 in normalem Magengewebe, Magenkarzinomen und Magenkarzinomzelllinien des Menschen

Ob CEACAM20 in Tumoren epithelialen Ursprungs wie dem Magenadenokarzinom auf RNA-Ebene exprimiert wird, sollte im Folgenden geklärt werden. Von vier verschiedenen Patienten dienten Magennormalgewebe und zugehöriges Magenadenokarzinomgewebe (erhalten von Dr. van den Engel, Chirurgie, LMU München), sowie sechs humanen Magenkarzinomzelllinien, zur Gewinnung von RNA.

4.1.1.1 Quantitativer Nachweis von CEACAM20-mRNA in Magenkarzinomgewebe und zugehörigen Normalmagengewebe mittels *real-time*-PCR

In den durchgeführten Versuchen fand nur RNA Verwendung, die bestimmten Qualitätsanforderungen ($RIN \geq 7,0$) entsprachen (Kapitel 3.1.16). Ein Mikrogramm RNA wurde mittels sogenannter *random hexamer primers* umgeschrieben (Kapitel 3.1.17). Als Kontrolle für die erfolgreiche Umschreibung der mRNA in cDNA, sowie zur Normierung wurde eine quantitative *real-time*-PCR zum Nachweis des

housekeeping-Gens β -Aktin durchgeführt. Dabei geht man davon aus, dass in jeder eukaryontischen Zelle ungefähr die gleiche Menge β -Aktin vorliegt (Weeds et al., 1982).

RNA aus Magennormalgewebe und entsprechendem Magenkarzinomgewebe, sowie Magenkarzinomzelllinien wurde nach Umschreibung in cDNA mittels quantitativer PCR analysiert. Die relativen CEACAM20-cDNA-Konzentrationen wurden in Relation zum β -Aktin-cDNA-Gehalt gesetzt. Zur Kontrolle der Größe und Reinheit der PCR-Produkte wurden eine Agarose-Gelelektrophorese, sowie eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Nach Agarose-Gelelektrophorese zeigte sich nur ein DNA-Fragment der erwarteten Größe (Ergebnisse nicht gezeigt). Als Negativkontrolle wurde für jedes Primerpaar eine Wasserprobe mitgeführt. In Vorversuchen wurde die Kolonkarzinomzelllinie W25+ bereits als CEACAM20-mRNA-exprimierend identifiziert und diente deshalb als Positivkontrolle. Auch wurde eine niedrig exprimierende HEK293T-Zelllinie mitgeführt. Es zeigte sich bei Patienten 500, 494 und 492 eine geringere CEACAM20-mRNA-Expression im Magenkarzinomgewebe im Vergleich von Magennormalgewebe. Im Gegensatz dazu war bei Patient 488 die *CEACAM20*-Expression im Karzinomgewebe erhöht (Abbildung 11).

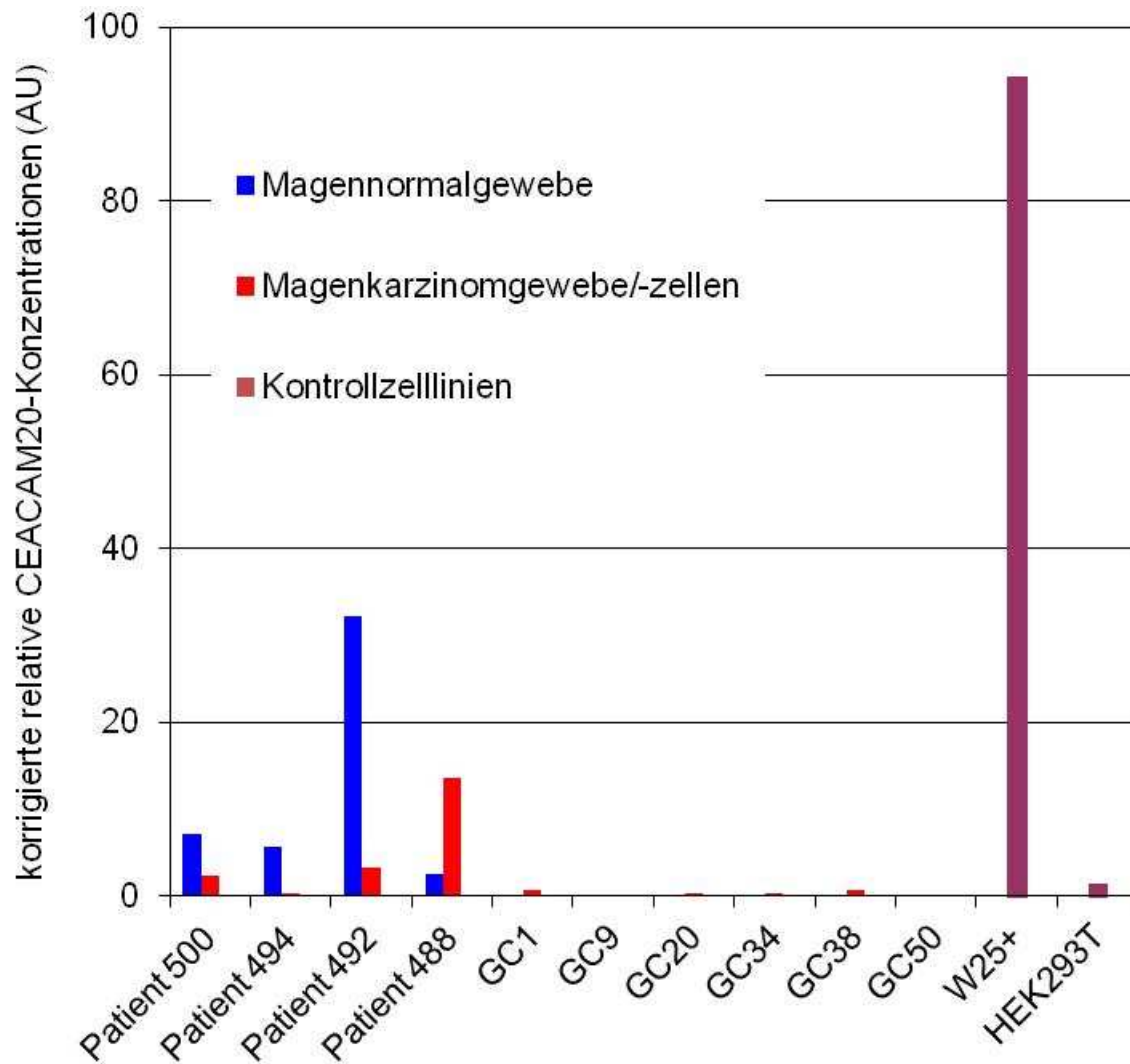


Abbildung 11: Quantifizierung von CEACAM20-mRNA in Magenadenokarzinomgewebe, zugehörigem Magennormalgewebe und Magenkarzinomzelllinien. Im Light-Cycler® wurde für alle Gewebe der CEACAM20- sowie β -Aktin-cDNA-Gehalt durch qRT-PCR (40 Zyklen) quantifiziert. Die Primer-Sequenzen für CEACAM20 wurden im N- bzw. A1-Domänen-kodierenden Bereich gewählt. Wie im Material und Methodenteil beschrieben wurde mithilfe der Cp-Werte jeder CEACAM20-cDNA-Gehalt auf den β -Aktin-cDNA-Gehalt bezogen. In Patient 500, 494 und 492 sank der CEACAM20-Gehalt in Vergleich von Magennormalgewebe zu Magenkarzinomgewebe. Dagegen war bei Patient 488 der CEACAM20-Wert im Karzinomgewebe erhöht. Alle Magenkarzinomzelllinien (GC1, GC20, GC34, GC38) zeigten einen vergleichsweise niedrigen CEACAM20-mRNA-Gehalt. Keine CEACAM20-RNA konnte bei GC9 und GC50 detektiert werden. Als Positivkontrolle diente die Kolonkarzinomzelllinie W25+. Zum Vergleich wurde die niedrig exprimierende HEK293T-Zelllinie getestet.

4.1.2 Untersuchung des Expressionsmusters von CEACAM20 in Magenkarzinom- und normalem Magengewebe auf Proteinebene

4.1.2.1 Untersuchung der Antikörperspezifität

Zunächst sollte getestet werden, ob die Spezifität des monoklonalen Anti-Human-CEACAM20-Antikörpers 6G4A5 in unfixiertem Gewebe der des polyklonalen Anti-

Human-CEACAM20-Mausserums (Eisenried, 2009) entspricht. Letzteres wurde durch genetische Immunisierung von Mäusen mit Hilfe eines CEACAM20-Expressionsvektors hergestellt. Das vor der Immunisierung entnommene Serum (Präimmunserum) diente als Negativkontrolle. Zur Testung wurden Zytospins von stabilen, konditional CEACAM20-exprimierenden Transfektanten (Charakterisierung der Zellen, siehe weiter unten) 48 h nach Induktion mittels Doxyzyklin hergestellt. Es folgte eine immunzytologische Färbung sowohl mit dem polyklonalen Mausserum, als auch mit dem monoklonalen 6G4A5 Anti-CEACAM20-Antikörpers. Als Negativkontrolle dienten Zytospins von nicht induzierten Transfektanten, sowie induzierten Transfektanten, die mit Präimmunserum inkubiert wurden. Mit monoklonalen und polyklonalen CEACAM20-Antikörpern ist eine vergleichbar selektive Färbung von CEACAM20 exprimierenden Zellen zu erkennen (Abbildung 12).

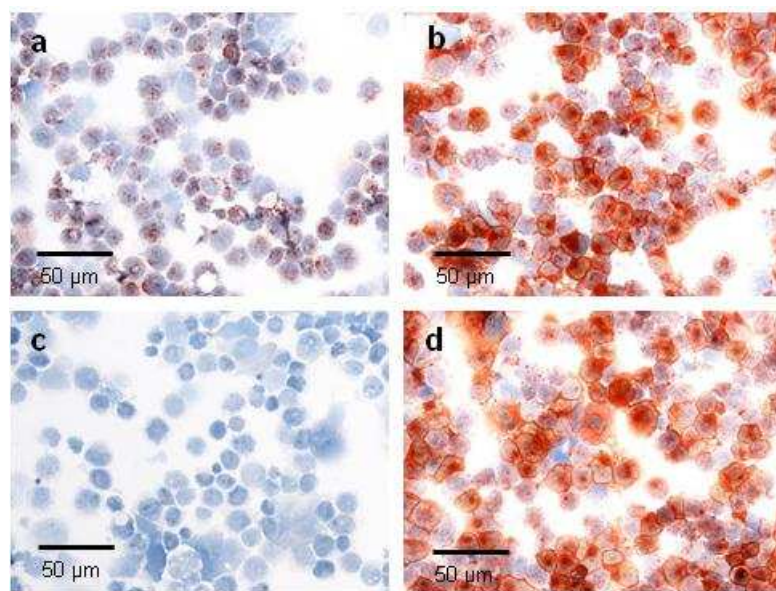


Abbildung 12: Selektiver Nachweis von CEACAM20 mit Anti-CEACAM20-Mausserum und dem monoklonalen CEACAM20-Antikörper 6G4A5 in der Immunzytologie. Es wurden Zytospins von der stabilen Transfektante Klon 14 ohne (a) und mit 48-stündiger Induktion durch Doxyzyklin angefertigt (b, c, d). Nach Färbung mit dem monoklonalen CEACAM20-Antikörper (20 µg/ml) zeigte sich eine membranständige Markierung (b). Diese war mit polyklonalem Mausserum (Verdünnung 1:100) reproduzierbar (d). Als Negativkontrollen dienten mit 1:100 verdünntem Präimmunserum inkubierte Doxyzyklin-induzierte Klon-14-Zellen (c) und nicht induzierte, wie oben mit 6G4A5 inkubierte Zellen (a). Nichtinduzierte Zellen zeigen eine unspezifische Färbung der Vakuolen, da sich auch die Färbung der HEK293T-Elternzelle ähnlich zeigte (nicht dargestellt). Die Negativkontrolle mit Präimmunserum zeigt keinerlei Anfärbung (c).

4.1.2.2 CEACAM20-Proteinnachweis in Magenkarzinomgewebe

Da durch qRT-PCR in Gesamt-RNA aus Magentumorgewebe nur sehr geringe CEACAM20-mRNA-Mengen nachgewiesen werden konnten (Abbildung 11), sollte durch Immunzytologie untersucht werden, ob bestimmte Tumorzellsubpopulationen in pathologisch gesicherten Adenokarzinomen des Magens besonders CEACAM20 exprimieren. Magenkarzinomgewebeschnitte vom intestinalen (Typ I, 3 Patientenproben) und diffusen Typ (Typ II, 4 Patientenproben) wurden mittels der Peroxidase-methode (ImmPRESS) angefärbt. Als Primärantikörper dienten der monoklonale Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 und der polyklonale Antikörper. Als Negativkontrolle wurden Gewebeschnitte mit dem monoklonalen MOPC-Antikörper, bzw. dem murinen Präimmunserum inkubiert. In den verschiedenen Patientenproben zeigte sich bei Verwendung des polyklonalen Antikörpers eine regelmäßige, wiederholbare Färbung im apikalen Bereich der Epithelzellen und Vakuolen (Abbildung 13 b, e). Interessanterweise zeigten in ein Lymphgefäß infiltrierte Tumorzellaggregate CEACAM20-positive Zellen an der Oberfläche des Aggregats (Abbildung 13 h). Eine vergleichbare Tumorzellfärbung wurde bei Verwendung des Präimmunserums nicht beobachtet (Abbildung 13 a, d). Bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers 6G4A5 konnten keine verlässlichen Färbungen erzielt werden (Abbildung 13 c, f). Vielmehr zeigte sich eine starke Hintergrundfärbung vor allem von Monozyten und glatten Muskelzellen. Insgesamt ist zu vermuten, dass der monoklonale Antikörper bestimmtes, in Paraffin eingebettetes Gewebe (evtl. abhängig vom Fixierungsausmaß) nicht zuverlässig färben kann. Derselbe Effekt wurde auch in einer anderen Arbeitsgruppe beim Färben von Schnitten von Formaldehyd fixierten, Paraffin eingebetteten Prostatakarzinomgeweben beobachtet (Hui Zhang, Immunology Department, City of Hope, Duarte, CA, USA, persönliche Mitteilung).

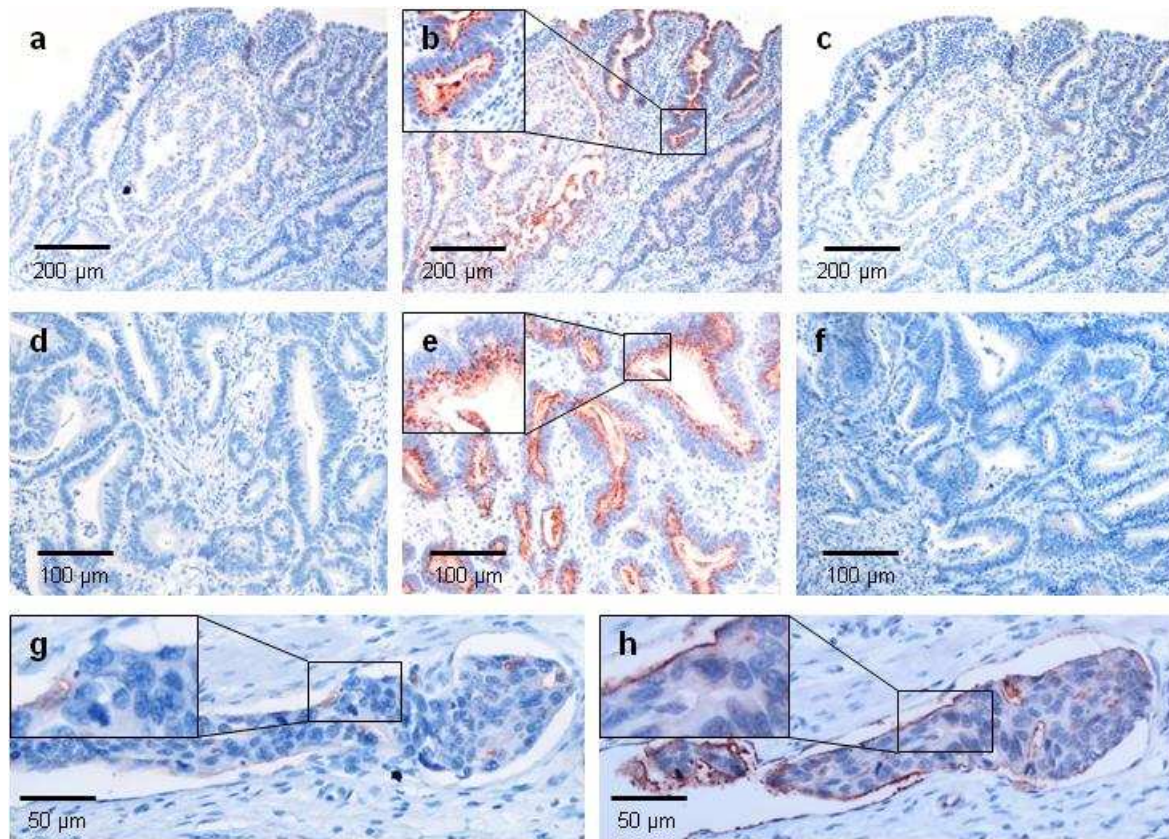


Abbildung 13: Analyse der CEACAM20-Expression mittels Immunhistologie im Magenkarzinom. Paraffinschnitte von Magenkarzinomgewebe (beides intestinaler Typ) von Patient 1 (a-c) und Patient 2 (d-f) wurden als Negativkontrolle mit Präimmunsersum (a, d), mit polyklonalem Anti-CEACAM20-Immunsersum (Verdünnung 1:100; b, e) oder monoklonalem Antikörper 6G4A5 (20 µg/ml) angefärbt (c, f). Es zeigte sich eine apikale Färbung der Magenkrypten die sich beim Übergang der relativ gut differenzierten Magenkarzinomzellen in dedifferenzierte Magenkarzinomzellen deutlich abschwächte (b, e). In doppelter Vergrößerung wurden auch gefärbte perinukleäre Strukturen sichtbar, welche kleine gut umschriebene Vakuolen darstellen. Trotz mehrfacher Wiederholung des Experiments konnte keine Färbung mit dem monoklonalen Antikörper erzielt werden (c, f). Es war der Einbruch des Magenkarzinoms in ein Lymphgefäß zu sehen (g), (h). Bei Gebrauch des polyklonalen Antikörpers (Verdünnung 1:100) stellte sich eine apikale Färbung der Magenkarzinomzellen, sowie eine mäßige Anfärbung des Lymphspaltes dar (h). Bei Verwendung des Präimmunsersums (Verdünnung 1:100) zeigte sich eine deutlich abgeschwächte und eventuell unspezifische Anfärbung (g).

4.1.2.3 Expression von CEACAM20 im Ovar

Um die Rolle von CEACAM20 in Tumorgewebe verstehen zu können, ist es hilfreich seine Funktion in Normalgewebe näher zu kennen. Bisher wurde CEACAM20-mRNA hauptsächlich in Dünndarm (Papistella, 2009), aber auch in Hodengewebe (Riesenberg, persönliche Mitteilung) gefunden. In letzterem konnten Leydig-Zellen als CEACAM20-produzierend identifiziert werden. Um Hinweise auf weitere CEACAM20 exprimierende Normalgewebe zu erhalten, wurde die GEO database verwendet. In dieser Datenbank sind die Expressionsdaten eines Großteils der publizierten Transkriptomanalysen gespeichert. Transkriptomanalyse von 61 murinen

Zelltypen und embryonalen und adulten Normalgeweben zeigt neben der erwarteten Expression von *Ceacam20* in Dünndarm und Dickdarm, einen hohen Gehalt an *Ceacam20*-mRNA-Gehalt in Oozyten und befruchteten Eizellen der Maus (Su et al., 2004). Die Analyse der Daten von Pan et al. (2005) und Zeng et al. (2004) zeigte eine vergleichsweise starke Expression von *Ceacam20* in verschiedenen Oozytenreifestadien und in frühen embryonalen Zellstadien (Abbildung 14).

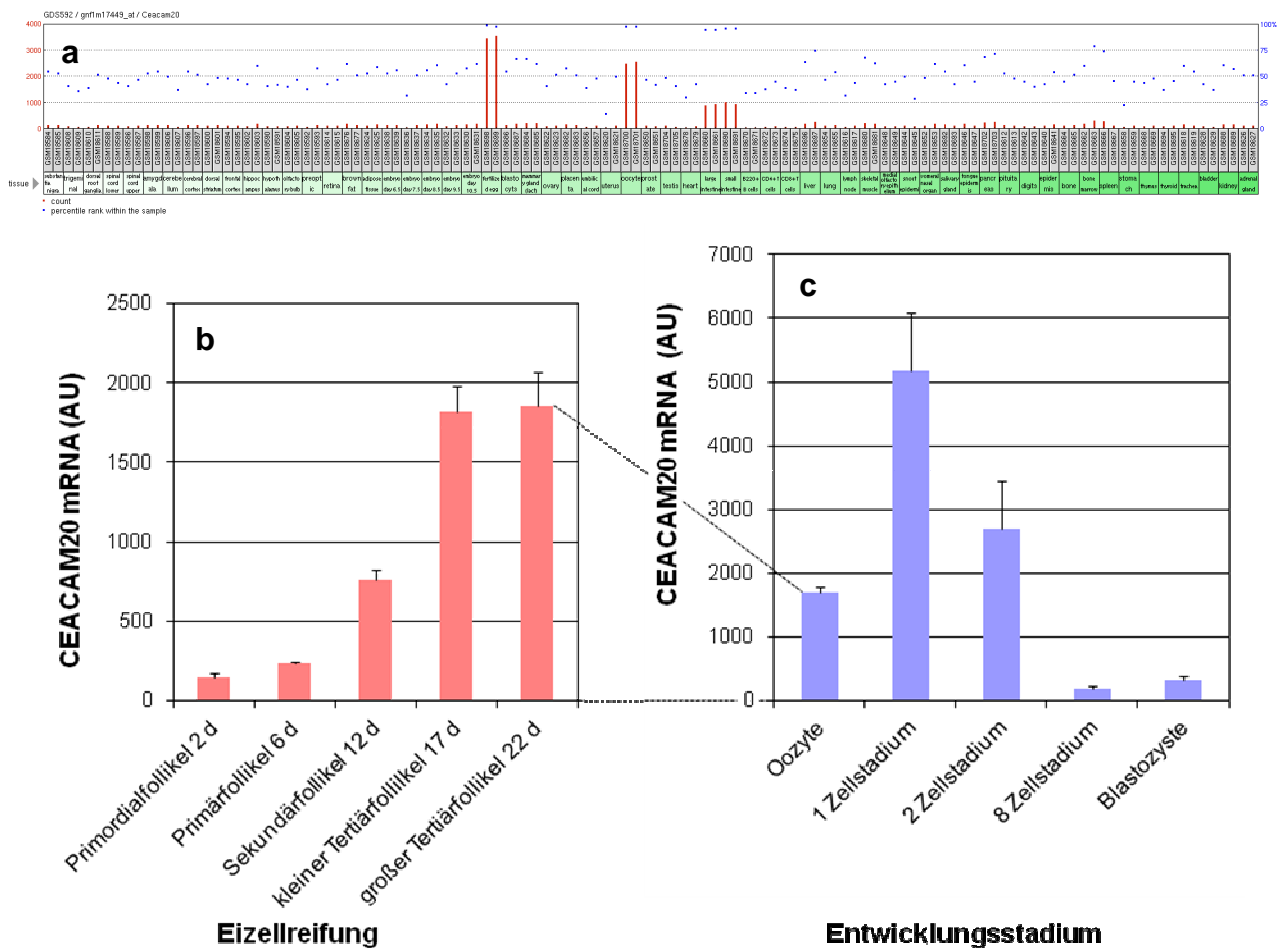


Abbildung 14: Ceacam20-Expression während der murinen Oozytenreifung und frühen Embryoentwicklung. Die Expressionsdaten wurden durch Suche von „CEACAM20, oocyte, Mus musculus“ in der GEO Profiles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles>) gefunden (DataSet Record GDS592, Su et al., 2004, GDS1266, Pan et al. (2005) und GDS814, Zeng et al. (2004)). Für die Multigewebsexpressionsanalyse wurden C57BL/6-Mäuse (a), der Oozytenreifung wurden B6SJLF1-Mäuse (b) und für die der Präimplantationsembryonen CF-1 x B6D2F1/J-Mäuse (c) verwendet (n = 4 männliche bzw. 3 weibliche Mäuse (a); n = 4 für alle Stadien). Eindeutige Expression von *Ceacam20* findet man in abnehmender Stärke in befruchteten Eizellen, Oozyten und Dün- und Dickdarm (a). Während der Oozytenentwicklung steigt mit zunehmendem Reifestadium (Primordialfollikel -> großer Tertiärfollikel) der *Ceacam20*-mRNA-Gehalt. Nach zunächst etwa gleichbleibender *Ceacam20*-Expression bei Entwicklung zur Oocyte, steigt diese deutlich im 1-Zellstadium (befruchtete Eizelle) an. Danach fällt die Expression wieder ab und behält im Folgenden ein niedriges Niveau im sich entwickelnden Embryo (b, c). Die blauen Quadrate in (a) sind ein Maß für die Expressionsstärke im Vergleich zu allen anderen Proben. Einhundert bedeutet, dass die Probe zu der Gruppe der am stärksten exprimierten Gene gehört.

Um dieses Ergebnis auch in humanem Gewebe zu prüfen, wurden Paraffinschnitte aus Ovargewebe verschiedener Patientinnen mit der Peroxidase-Methode immunhistologisch mit polyklonalem Anti-CEACAM20-Mausserum und dem monoklonalen Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 gefärbt. Es zeigte sich eine Färbung im Bereich des Follikelepithels (der *Zona pellucida*) und eine schwächere Färbung im *Antrum folliculi* des Tertiärfollikels (Abbildung 15 b, c und e, f).

Auch wurden eine leichte Anfärbungen im Follikelepithel, der *Theca interna* und der *Theca externa* entdeckt. Im direkten Vergleich erkannte man, dass die *Zona pellucida* im Primärfollikel stärker angefärbt scheint als in dem Tertiärfollikel, welches ein höheres Reifungsstadium darstellt. Keinerlei Färbung war bei Verwendung des gleichartig verdünnten Präimmunserums zu beobachten (Abbildung 15 a, d). Jedoch ist hierbei anzumerken, dass gerade die *Zona pellucida* einen besonders hohen Anteil an Glykoproteinen besitzt, an welchen sowohl der monoklonale Antikörper als auch das polyklonale Mausserum unspezifisch binden könnten. Da Präimmunseren in der Regel deutlich weniger Antikörper als Hyperimmunseren enthalten, ist das Fehlen einer Färbung mit dem Präimmunserum im Allgemeinen kein zwingender Beweis für die Spezifität einer Immunfärbung.

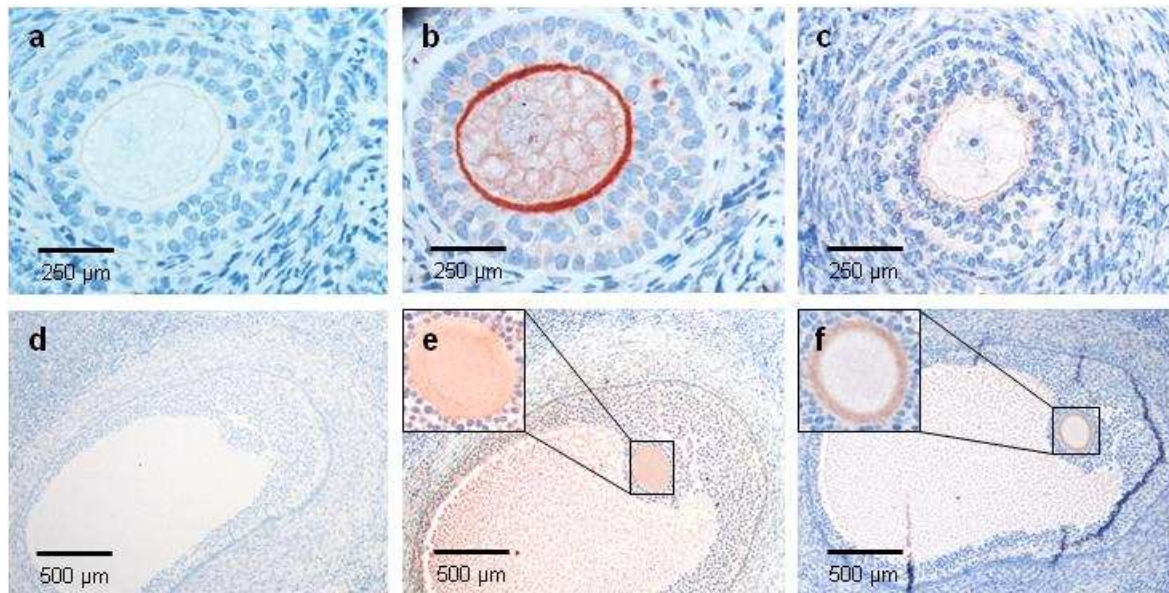


Abbildung 15: Immunhistologische Färbung von Ovargewebe-Paraffinschnitten zum Nachweis von CEACAM20. Bei Färbung der verschiedenen Reifungsstadien der Follikel mit dem polyklonalen (Verdünnung 1:100; b, e) oder dem monoklonalen Anti-CEACAM20-Antikörper (6G4A5; Konzentration 20 µg/ml; c, f) zeigte sich eine Färbung der *Zona pellucida*. Diese war im Tertiärfollikel (e, f) schwächer ausgeprägt als im Primärfollikel (b, c). Insgesamt war die Färbung mit dem polyklonalen Antikörper (b, e) stärker als die mit dem monoklonalen Antikörper (c, f). Das Präimmunserum (1:100 verdünnt) diente als Negativkontrolle und zeigte keinerlei Anfärbung (a, d).

4.2 Funktionsanalysen von CEACAM20

4.2.1 Herstellung und Charakterisierung von stabilen induzierbaren CEACAM20-exprimierenden Transfektanten

Für die Funktionsanalyse von CEACAM20 wurde ein induzierbarer Expressionsvektor benötigt. Grund hierfür waren Vorversuche, welche Hinweise auf einen hemmenden Einfluss von CEACAM20 auf die Vitalität der Zellen erbrachten. Hierbei erschien der Tet-on-Expressionsvektor pRTS als besonders geeignet, da die zu untersuchenden Gene sehr strikt nur nach Zugabe von Doxzyklin exprimiert werden (Bornkamm et al., 2005). Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurde die Methode der induzierbaren Expression mittels des Tet-on-Expressionsvektorsystems in unserem Labor etabliert.

4.2.1.1 Klonierung der CEACAM20-cDNA in pRTS

Die Klonierung in pRTS erfolgte in zwei Schritten (detaillierte Beschreibung findet sich in Kapitel 3.1.14.1. CEACAM20-cDNA wurde zuerst in den Zwischenvektor pCTWOSFI eingefügt. Durch einen Restriktionsendonukleaseverdau mit *Sfi*I konnte das Insert aus dem Zwischenvektor pCTWOSFI-CEACAM20 heraus geschnitten und in den pRTS-Vektor kloniert werden (Abbildung 6). Da die Klonierung von CEACAM20-cDNA ungerichtet erfolgte, entstanden somit zwei Orientierungen. Durch einen Doppel-Restriktionsendonukleaseverdau konnte die jeweilige Orientierung der cDNA bestimmt werden (Tabelle 1; Abbildung 7).

4.2.1.2 Screening der Zellklone auf Induzierbarkeit und CEACAM20-Expression mittels CELISA

Um funktionelle Tests durchführen zu können, musste das pRTS-CEACAM20-Expressionsplasmid stabil in HEK293T-Zellen transfiziert werden. Es konnten 18 Zellklonkolonien isoliert werden. Diese wurden anschließend auf ihre Induzierbarkeit durch 1 µg/ml Doxzyklin anhand der Expression von CEACAM20 getestet. Dafür erschien der CELISA besonders gut geeignet, da man mit dieser Methode viele Zellklone gleichzeitig auf CEACAM20-Expression untersuchen konnte und dies bereits mit einer kleinen Zellzahl möglich war. Die Methode wurde wie in Kapitel

3.3.2 beschrieben durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte HEK293T-Zellen und als Positivkontrolle dienten CEACAM-20 exprimierende COS-7-Zellen (erhalten von Michaela Paptistella). In der Fluoreszenzmessung der Proben zeigte CEACAM20-K9 (C20-K9) und CEACAM20-K14 (C20-K14) nach Zugabe von Doxyzyklin erhöhte Fluoreszenzwerte. Dies lies die Schlussfolgerung zu, dass beide Klone unter Induktion vermehrt CEACAM20 an der Zelloberfläche exprimieren. Sie wurden für weitere Versuche ausgewählt. Die anderen Klone schienen entweder nur geringfügig oder nicht induzierbar zu sein. Repräsentativ für nichtinduzierbare Klone wurden CEACAM20-K21 und CEACAM20-K22 für weitere Testungen mitgeführt. Insgesamt wiesen von den 18 getesteten Zellklonen nur 2 Zellklone eine gute CEACAM20-Induzierbarkeit auf. Dies entspricht einer Effizienz von 11,1 %.

4.2.2 Charakterisierung ausgewählter stabil transfizierter Zell-klone auf Induzierbarkeit und CEACAM20-Expression

4.2.2.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Die im CELISA positiv identifizierten CEACAM20-K9 und CEACM20-K14 wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie genauer charakterisiert. Auch wurden die nichtinduzierbaren CEACAM20-K21 (C20-K21) und CEACAM20-K22 (C20-K22) beispielhaft mitgetestet. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte HEK293T-Elternzellen. Die Induktion erfolgte für 48 h mit 1 µg/ml Doxyzyklin. Die durchflusszytometrische Analyse bestätigte die CELISA-Ergebnisse, dass C20-K9 und C20-K14 induzierbar waren und CEACAM20 an ihrer Obefläche exprimierten (Abbildung 16 a, b) und bei C20-K21 und C20-K22 nach Zugabe von Doxyzyklin kein CEACAM20 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 16 c, d). Dies legte nahe, dass bei Letzteren die CEACAM20-Expressionseinheit, jedoch nicht die Hygromycin-Resistenz-Expressionskassette beschädigt war. Im nicht induzierten Zustand waren alle Zellklone CEACAM20 negativ und ergaben bei Vergleich mit den untransfizierten HEK293T-Zellen einen nahezu identischen Kurvenverlauf (vergleiche grüne und rote Histogramme in (Abbildung 16 a-d). C20-K14 zeigte unter Induktion eine geringere und homogenere CEACAM20-Expression als C20-K9 (Abbildung 16 a, b). C20-K9 zeigt ein mehrgipfliges Histogramm, das von geringerer CEACAM20-Expression bis zu sehr hoher CEACAM20-Expression reichte. Dies führte zu der Vermutung, dass die Zellpopulation sich aus mehreren Klonen zusammengesetzen könnte. Analyse

mehrerer Subklone (ausgehend von Einzelzellen) erbrachte keine Population mit einheitlicher CEACAM20-Expression. Somit lies sich vermuten, dass der Zellklon C20-K9 trotz seines heterogenen Aussehens aus einer einzelnen Zelle entstand. Allerdings, bleibt an dieser Stelle unklar, wodurch die Heterogenität der CEACAM20-Expressionsstärke bedingt ist.

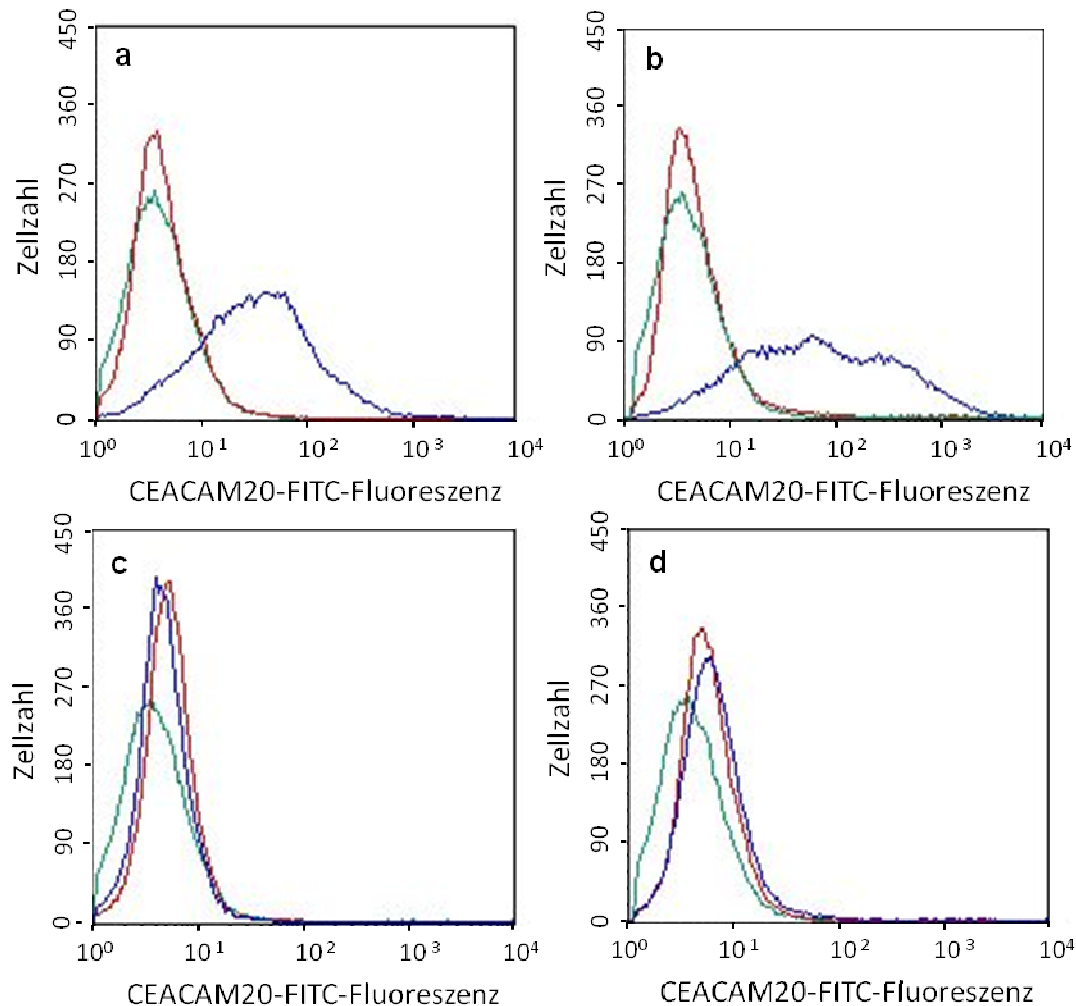


Abbildung 16: Testung der stabilen pRTS-CEACAM20-Transfektanten auf Induzierbarkeit von CEACAM20-Expression. Die stabilen Transfektanten C20-K14 (a), C20-K9 (b), C20-K21 (c) und C20-K22 (d) wurden mit 1 µg/ml Doxyzyklin für 48 h inkubiert (blaue Kurven) oder blieben in Parallelkulturen unbehandelt (rote Kurven) und ihre CEACAM20-Expression wurde mittels Durchflusszytometrie nach Inkubation mit dem Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 und einem markiertem Zweitantikörper bestimmt. Als Negativkontrolle dienen nicht transfizierte HEK293T-Zellen (grüne Kurven).

4.2.2.2 Western blot

Um zu überprüfen, ob CEACAM20 in den unterschiedlich stark exprimierenden Klonen die gleiche Größe aufweist, wurden Zellextrakte mittels *Western blot* untersucht. Bei der konstitutiv CEACAM20-exprimierenden Transfektante (Cos7-C20) sowie nach Doxyzyklininduktion zeigten sich bei C20-K9, nicht aber bei C20-

K14 Doppelbanden für CEACAM20, die sich um 16 kDa voneinander unterschieden (Abbildung 17 a). Dies könnte entweder durch Glykosilierungsunterschiede oder durch eine Protease-sensitive Stelle zwischen der A1- und B1-Domäne verursacht sein (Abbildung 17 b), denn die N- und A1-Domäne haben zusammen eine relative Molekularmasse von etwa 15,6 kDa. Hierbei wurden die Kohlehydratgruppen zweier möglicher Glykosilierungsstellen mitgerechnet. Eine C-terminale Verkürzung kam nicht infrage, da in einer CEACAM20-Mutante ohne zytoplasmatische Domäne, ebenfalls 2 Varianten auftraten, die sich um 16 kDa in ihrer Größe unterschieden (Abbildung 23). In Zellen ohne Doxyzyklininduktion und in HEK293T-Elternzellen konnte kein CEACAM20 detektiert werden, noch waren weitere Banden zu sehen. Dies spricht für die „Dichtheit“ (*non leakiness*) des Tet-on-Systems und für die Spezifität des CEACAM20-Antikörpers 6G4A5.

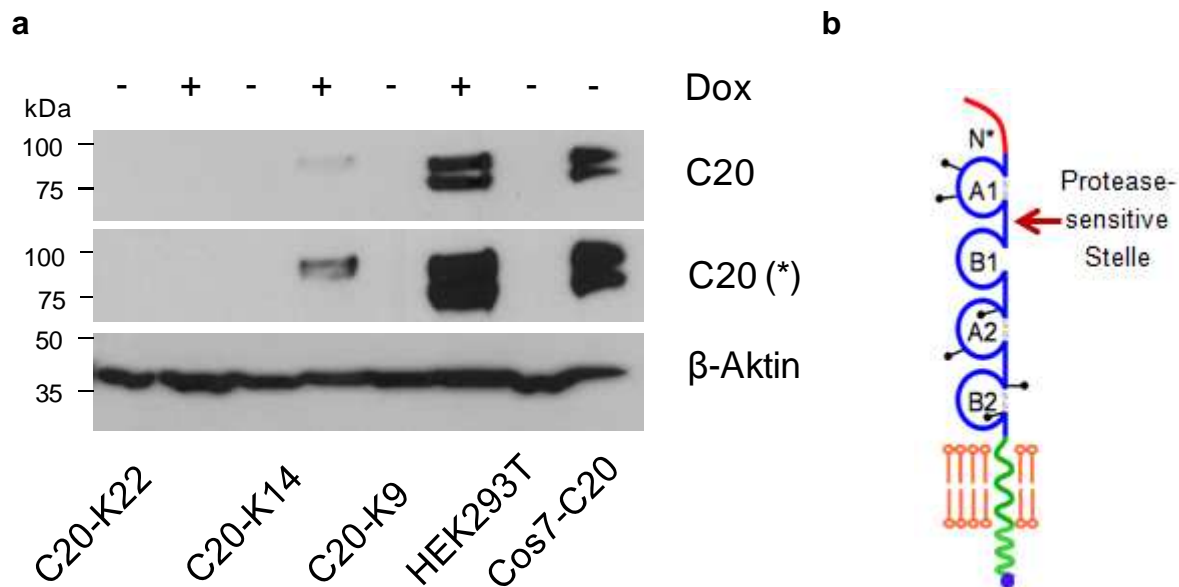


Abbildung 17: Quantifizierung von CEACAM20 in ausgewählten stabilen pRTS-CEACAM20-Transfektantenklonen (a), Domänenanordnung des CEACAM20 (b). Die Transfektanten wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von 1 μ g/ml Doxyzyklin für 48 h kultiviert und anschließend lysiert. Jeweils 20 μ g Gesamtprotein wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese größenfraktioniert und auf eine Membran transferiert. CEACAM20 (C20) wurde mit dem Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 detektiert (a). Es zeigte sich, dass bei C20-K9 und C20-K14 nur unter Induktion CEACAM20-Protein nachweisbar war; ohne Induktion konnte auch bei längerer Belichtungszeit kein Protein detektiert werden. Auffallend ist, dass trotz dem Einsatz derselben Proteing Gesamtmenge, C20-K9 mehr CEACAM20 exprimiert als C20-K14. Deshalb ist die Bande von C20-K14 erst bei längerer Belichtung zu erkennen C20 (*). Bei C20-K22 lies sich auch unter Induktion kein Protein nachweisen. HEK293T-Elternzellen dienten als Negativkontrolle, COS7-CEACAM20 als Positivkontrolle. In allen Zelllysaten konnte jedoch, unabhängig vom CEACAM20-Gehalt, etwa gleich viel β -Aktin nachgewiesen werden (a). In der Domänenanordnung von CEACAM20 markiert der rote Pfeil die mögliche Protease-sensitive Stelle (Erklärung siehe Text) (b).

4.2.2.3 CEACAM20 beeinträchtigt die Vitalität von HEK293T-Zellen

In Vorarbeiten mit stabilen CEACAM20-Transfektanten ließen Schwierigkeiten mit der Stabilität der Transfektanten einen Einfluß von CEACAM20 auf die Vitalität der Zellen vermuten (Paptistella, 2009). Die Wirkung von CEACAM20 auf die Zellen sollte über Zeiträume von mehreren Tagen untersucht werden. Deshalb mussten die Doxyzyklinkonzentrationen bestimmt werden, welche eine fortwährende maximale Induktion der CEACAM20-Expression erzielt.

Zur Bestimmung des Einflusses von CEACAM20 auf die Vitalität von HEK293T-Zellen wurden C20-K9 und C20-K14-Zellen in Gegenwart von steigenden Doxyzyklindosen von 3-1000 ng/ml für 6 Tage kultiviert. Danach wurde die Vitalität der Zellen mit Hilfe des *CellTiter-Blue®* Assays (siehe 3.2.10) gemessen. Bereits bei sehr geringen Doxyzyklindosen wurde die Vitalität der C20-K9-Zellen beeinträchtigt und bei 100 ng/ml war eine maximale Hemmung von rund 70% zu beobachten. Diese ließ sich selbst durch eine 10-fach höhere Doxyzyklinkonzentration nicht mehr steigern (Abbildung 18 a). Für die folgenden Versuche wurde aufgrund einer „großen therapeutischen Sicherheit“ eine Konzentration von 1000 ng/ml ausgewählt. Selbst bei einem denkbaren 99%-igen Verlust von Doxyzyklin durch Inaktivierung in Langzeitversuchen ist eine volle pharmakologische Wirksamkeit zu erwarten. Interessanterweise trat der maximale Verlust der Vitalität von 70% (C20-K9) bzw. 20% (C20-K14) erst 3-4 Tage nach Induktion mit Doxyzyklin auf (Abbildung 18 b). Diese Versuchsreihe bestätigte die Vermutung, dass die Instabilität von „stabilen“ CEACAM20-Transfektanten in der Tat durch eine Beeinträchtigung der Zellvitalität herrühren kann.

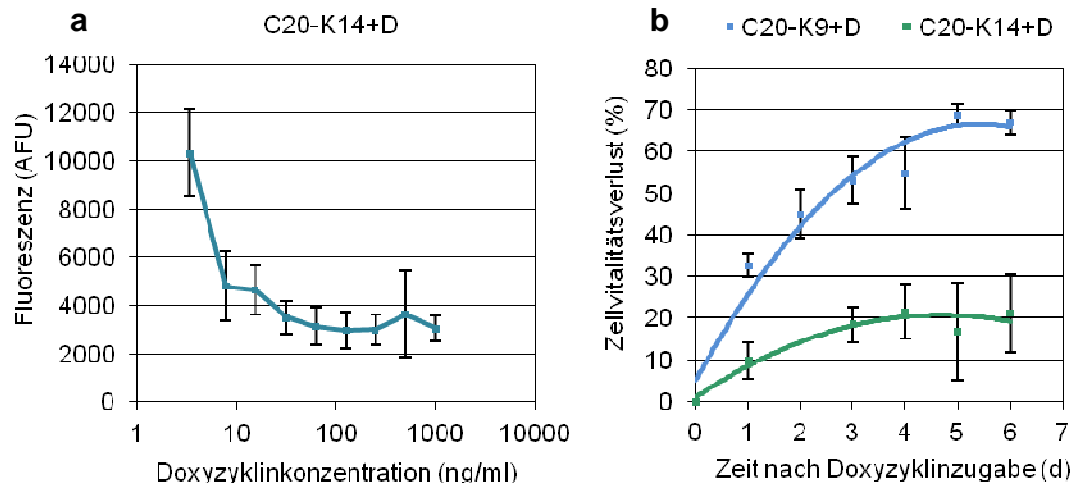


Abbildung 18: Induzierbarkeit des Tet-on-Promotors durch Doxyzyklin. Dosis-Wirkungsanalyse (a) und Kinetik der Vitalitätshemmung (b). In einer 96-well-Platte wurden 300 C20-K9-Zellen bzw. C20-K14-Zellen ausgesät. Nach einem Tag erfolgte die Induktion mit Doxyzyklinkonzentrationen zwischen 0-1000 ng/ml für 6 Tage (a) oder 1 µg/ml Doxyzyklin für die angegebenen Zeiträume in Gegenwart von 100 µg/ml Hygromycin (b). Die Vitalität wurde dann mit Hilfe des *CellTiter-Blue*-Tests bestimmt. Die Mittelwerte von 4 Parallelproben mit Standardabweichung sind angegeben.

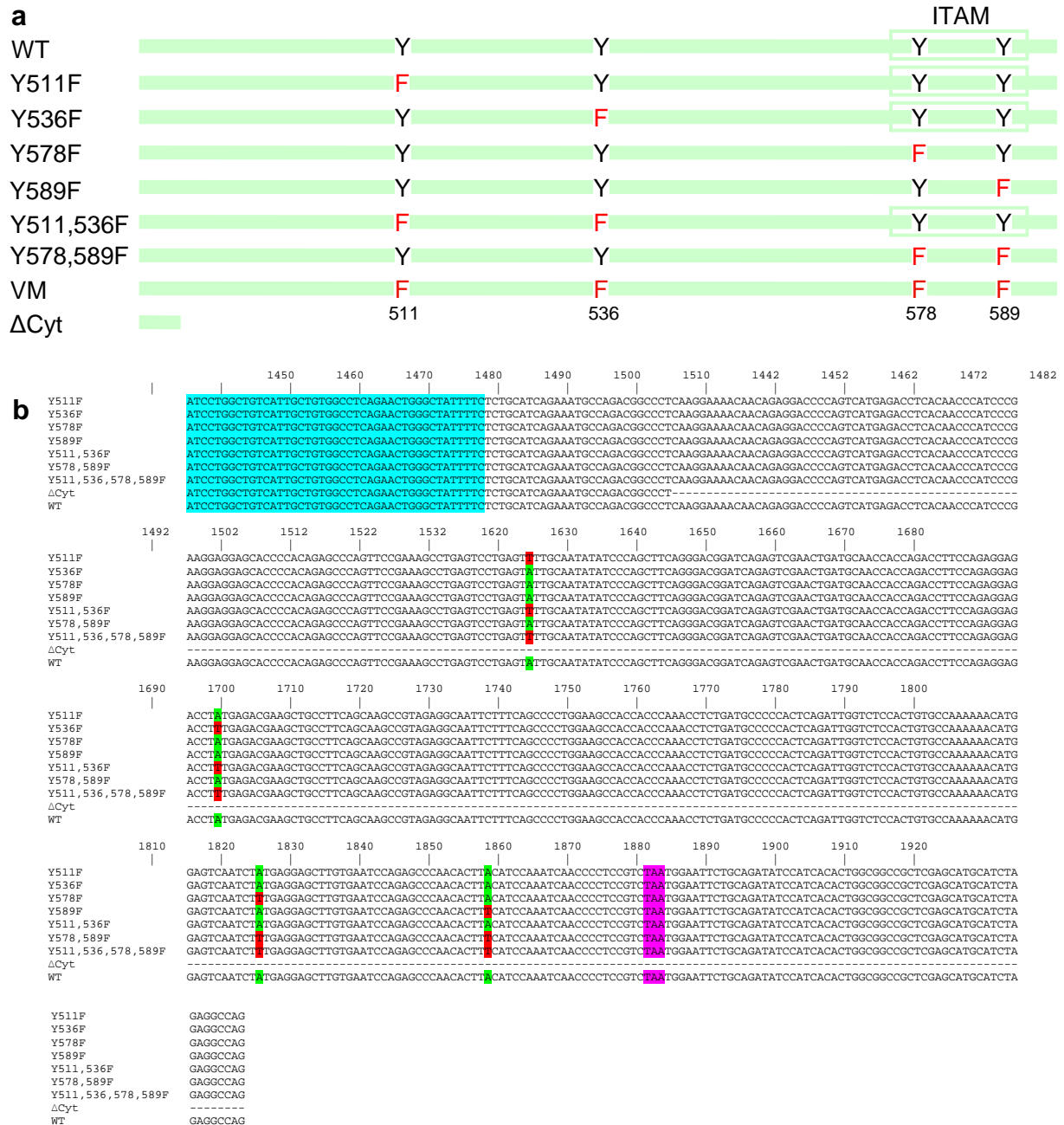
4.2.2.4 Hemmung der Zellvitalität und Zellproliferation wird nicht durch die zytoplasmatische Domäne vermittelt

Die zytoplasmatische Domäne von CEACAM20 enthält drei phylogenetisch hochkonservierte Tyrosine, die ein wichtiger Bestandteil zweier Signalmotive nämlich einem *GRB2-like SH2 domain binding motif* und einem ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) sind. Ein weiteres Tyrosin (Y536) ist nicht durchgängig konserviert (Kapitel 1.4, Abbildung 4). Um zu klären, ob eines dieser Motive oder andere, nicht annotierte Signalmotive für die Vermittlung der Vitalitätsbeeinträchtigung verantwortlich sind, wurden verschiedene CEACAM20-Punkt- und Deletionsmutanten hergestellt.

4.2.2.5 Herstellung von zytoplasmatischen Mutanten

Die Mutationen wurden in pRTS-CEACAM20 durch Verwendung geeigneter Primer und von Wildtyp-CEACAM20-Plasmiden oder in bereits Punktmutationen enthaltende CEACAM20-Plasmiden als *PCR-Template* eingeführt. Insgesamt wurden 8 verschiedene Punktmutationen auf DNA-Ebene durch die Methode der *site-directed mutageneses* eingeführt (Kapitel 3.1.15). Hierbei wurde mit zwei PCRs begonnen, die jeweils einen Teil des späteren Produkts generierten und sich gegenseitig über

das zu mutierende Basenpaar überlappten. Danach erfolgte die finale PCR mit den flankierenden Primern (pRTS-C20-f, pRTS-C20-r) (Abbildung 9). Als *template* dienten hierbei die beiden aufgereinigten PCR Produkte aus dem ersten Schritt. Die entstandenen Plasmide wurden aufgereinigt und einer Sequenzierung unterzogen.



Die eingefügten Basenpaar-Mutationen bewirkten auf Proteinebene einen Austausch der Aminosäure Tyrosin gegen Phenylalanin. Somit wird eine potentielle Phosphorylierung durch Tyrosinkinasen verhindert. Es entstanden vier Einzelmutationen (Y589F; Y578F; Y511F; Y536F), zwei Doppelmutationen (Y511, 536F; Y578, 589F) und eine Vierermutation (VM) (Y511, 536, 578, 589F). Die Mutante, welcher der zytoplasmatische Bereich fehlt (Δ Cyt), wurde durch Einführung eines Stoppkodons direkt am Übergang des Transmembranexons zum ersten Exon für die zytoplasmatische Domäne (Exon 8) erzeugt. Der kodierende Bereich der Δ Cyt-Mutante endet mit ...Ala-Arg-Arg-Pro.

4.2.2.6 Einfluss von CEACAM20-Mutanten auf die Zellvitalität

Verglichen wurde die Vitalität von HEK293T-Klonen C20-K9, C20VM-K40 und C20 Δ Cyt-K125, die stabil mit pRTS-CEACAM20 oder mit pRTS-CEACAM20-Y511,536,578,589F bzw. pRTS-CEACAM20- Δ Cyt transfiziert worden waren. Dies erfolgte ohne und mit Behandlung mit 1 μ g/ml Doxyzyklin über einen Zeitraum von 5 Tagen. Die Klone C20VM-K40 und C20 Δ Cyt-K125 wurden in unserer Gruppe von Birgit Stadlbauer hergestellt und für die weiteren Versuche verwendet. Die verschiedenen Klone zeigten nach Doxyzyklininduktion reproduzierbar eine unterschiedliche CEACAM20-Expression. Die durchflusszytometrisch bestimmte mittlere Fluoreszenzintensität der CEACAM20-exprimierenden Zellpopulation betrug für C20-K9, C20VM-K40 und C20 Δ Cyt-K125 273 ± 13 (SEM), 775 ± 20 bzw. 1033 ± 33 ($n = 2-3$).

Man erkannte im Zellvitalitätstest, dass bei allen Transfektanten ohne Doxyzyklin, ein exponentielles Wachstum und unter Induktion mit Doxyzyklin eine verminderte Vitalität zu beobachten war. Diese Wachstums-/Vitalitätsreduktion schien bei C20-K9 und C20VM-K40 ähnlich ausgeprägt, während diese bei C20 Δ Cyt-K125 stärker ausgebildet war (Abbildung 20 b, c, d). HEK293T-Zellen zeigten mit oder ohne Doxyzyklin gleiches Wachstumsverhalten, so dass ein direkter toxischer Einfluß von Doxyzyklin ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 20 a). Eine Hemmung der Zellvitalität bei den Transfektanten war frühestens nach 1-2 Tagen zu beobachten. Diese stieg danach stark an und ging schließlich in eine Sättigungsphase über. Eine halbmaximale Hemmung der Vitalität konnte nach rund 2-3 Tagen beobachtet werden (siehe *insets* (*) in Abbildung 20 b, c, d). Bei lichtmikroskopischer

Betrachtung der *wells* viel fiel auf, dass die Zellen nach Induktion mit Doxozyklin teilweise ihre Adhäsion verloren. Dieses Phänomen war sowohl bei dem CEACAM20-Wildtyp als auch bei den Mutanten zu beobachten.

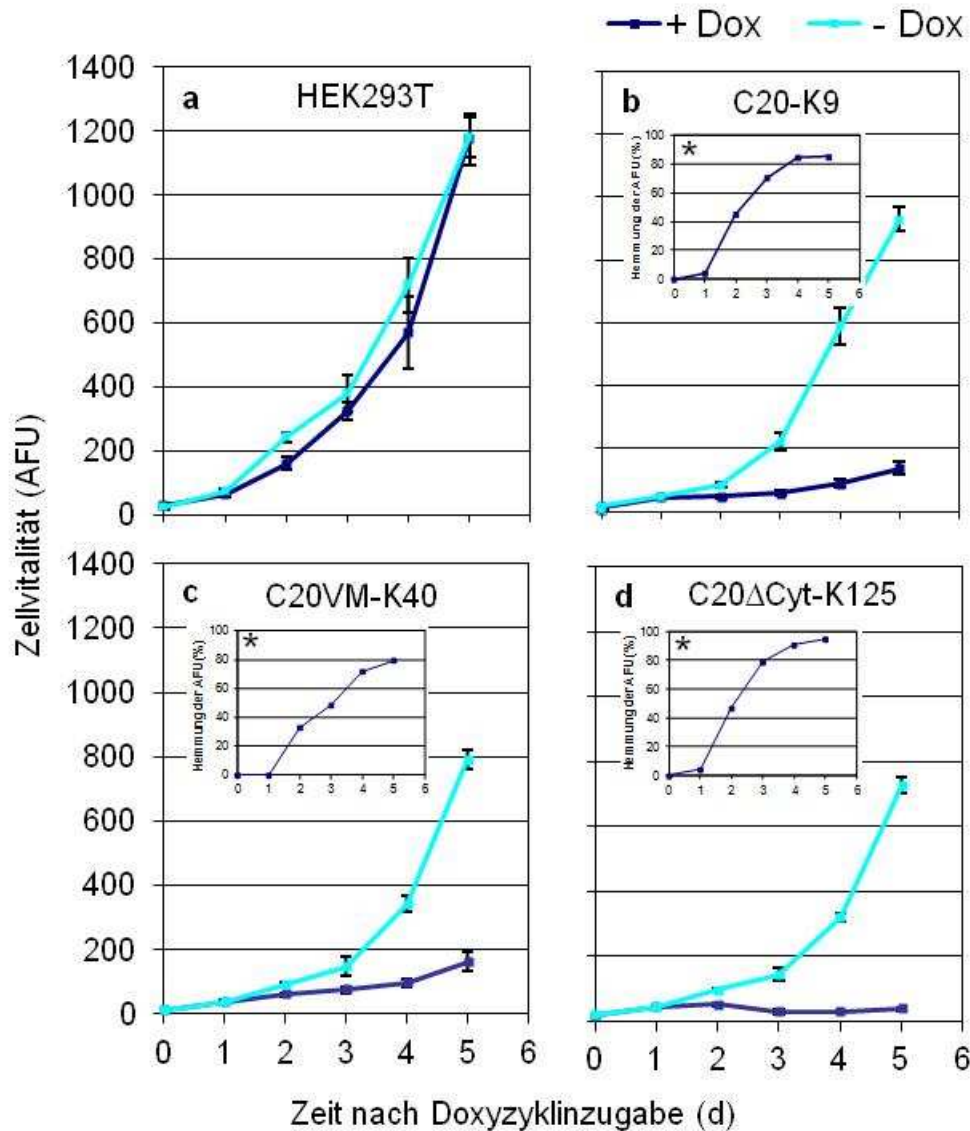


Abbildung 20: Die Hemmung der Zellvitalität ist unabhängig von CEACAM20-Signaltransduktion. Die HEK293T-Klone C20-K9 (b), C20VM-K40 (c) und C20ΔCyt-K125 (d) sowie HEK293T-Elternzellen als Kontrolle (a) wurden in einer Dichte von 900 Zellen pro *well* in einer 96-*well*-Platte ausplattiert und in Gegenwart oder Abwesenheit von 1 µg/ml Doxozyklin bis zu 5 Tage kultiviert. Die Vitalität wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mit Hilfe des *CellTiter-Blue®* Assays bestimmt. Die *insets* (*) stellen die Hemmung der Zellvitalität über den obengenannten Beobachtungszeitraum dar. Für die uninduzierten Klone jeder stabilen Transfektante zeigte sich ein exponentielles Wachstum (a-d). Mittelwerte und Standardabweichung sind dargestellt (n = 8). Eine Beeinträchtigung der Vitalität war frühestens 2 Tage nach Doxozyklinzugabe nachweisbar (b-d); halbmaximale Hemmung der Vitalität wurde nach circa 3 Tagen erreicht (*).

4.2.2.1 Einfluss von CEACAM20 auf die Zellproliferation

Bei den bisherigen Experimenten fiel auf, dass, mit der möglichen Ausnahme von CEACAM20 Δ Cyt-K125, selbst nach mehrtägiger Expression von CEACAM20 nur eine circa 70-80%-ige Hemmung der Vitalität zu beobachten war (Abbildung 20 b, c). Unklar blieb, ob nur eine CEACAM20-hochexprimierende Subpopulation vollständig gehemmt wurde und der Rest der Zellen unbeeinflusst weiter proliferierte, oder ob eine gleichmäßige Hemmung aller Populationen stattfand. Es erschien daher sinnvoll, das Wachstumsverhalten der Zellen zu überprüfen.

Hierfür wurden die stabilen pRTS-CEACAM20-Transfektanten (Kapitel 3.1.14.1) in 6-*well*-Platten mit je 5×10^4 Zellen kultiviert. Als Negativkontrollen dienten untransfizierte HEK293T-Zellen, denen Doxyzyklin zugesetzt wurde. Das Wachstumsverhalten der stabilen Transfektanten wurde in nicht-induziertem und induziertem Zustand verglichen. Alle nicht induzierten Zellen sowie die Doxyzyklin-behandelnden HEK293T-Zellen zeigten im Beobachtungszeitraum ein gleichartiges exponentielles Wachstum. Dies ist sichtbar an der linearen Zunahme bei halblogarithmischer Darstellung (Abbildung 21). Im induzierten Zustand kam es jedoch bei allen CEACAM20-exprimierenden Transfektanten (Wildtyp oder signaltransduktionsdefizient) zu einer Wachstumsverzögerung, welche den Ergebnissen des Zellvitalitätstest ähnelt. Bei diesem Langzeitexperiment fiel erneut auf, dass die induzierten Mutanten, als auch CEACAM20-Wildtyp Zellen bei Überexpression teilweise non-adhäsiv wurden.

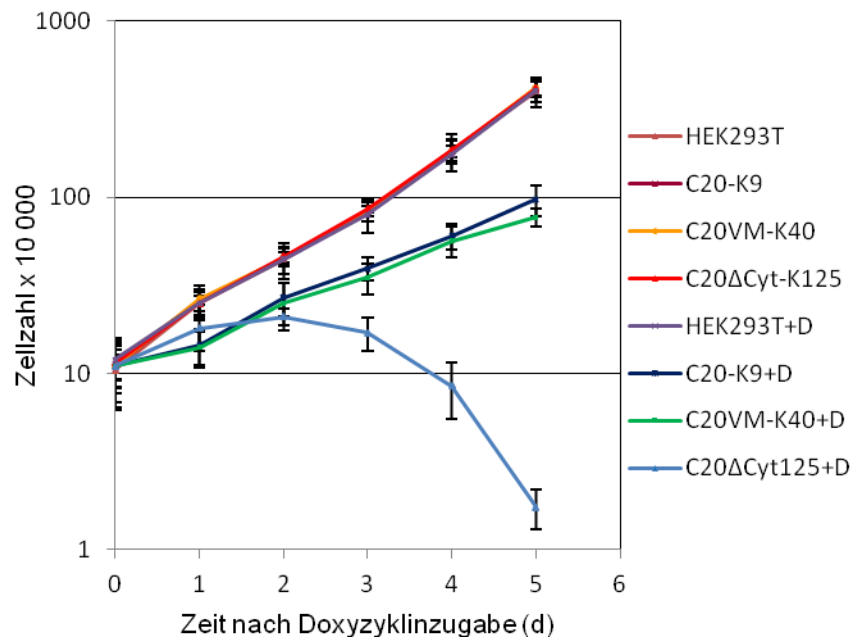


Abbildung 21: Einfluss von CEACAM20-Expression auf Wachstumsgeschwindigkeit von HEK293T-Zellen. Pro well einer 6-well-Platte wurden 1×10^5 HEK293T-Transfektanten C20-K9, C20VM-K40 und C20ΔCyt-K125 sowie Elternzellen für 5 Tage mit oder ohne 1 µg/ml Doxyzyklin kultiviert. Die Zellzahl wurde täglich mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Für alle Transfektanten, mit Ausnahme von CEACAM20ΔCyt-K125 unter Doxyzyklin, zeigt sich ein exponentielles Wachstumsverhalten. Bei den CEACAM20-exprimierenden Klonen C20-K9 und C20VM-K40 (Wildtyp bzw. Mutante ohne Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne) war eine reduzierte Proliferation zu beobachten (sichtbar an der geringeren Steigung der Geraden bei halblogarithmischer Darstellung). Dargestellt sind Mittelwerte ($n=4$) und Standardabweichungen.

4.2.2.2 Verlust von Adhäsion durch CEACAM20-Expression

Unter Induktion fiel bei den CEACAM20-induzierbaren Klonen eine verminderte Adhärenz der Zellen auf. Diese äußerte sich durch ein Abkugeln und Abschwimmen der Zellen nach Induktion. Bei CEACAM20-K9-Zellen waren beispielsweise ca. 60% der Zellen betroffen. Unklar blieb, warum nicht alle Zellen von diesem Phänomen betroffen waren. Da die CEACAM20-Expression nach Induktion durch Doxyzyklin oft sehr heterogen war (Abbildung 16) wurden bei CEACAM20-K9-Zellen untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Höhe der CEACAM20-Expression und einem Adhärenzverlust der Zellen bestand.

Dazu wurden CEACAM20-K9-Zellen für 48 h mit Doxyzyklin behandelt und die CEACAM20-Expression von abgelösten Zellen und adhären Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Als Negativkontrolle wurden nicht induzierte CEACAM20-K9-Zellen getestet. Bei den Zellen mit Adhärenzverlust zeigte sich eine Anreicherung der eher hoch exprimierenden CEACAM20-Zellen (Abbildung 22 a). Der kleinere Anteil dieser Zellen ist jedoch auch niedrig exprimierend. Dies könnte sich durch die

Tendenz der HEK293T-Zellen bedingt sein, sich relativ leicht vom Kultursubstrat zu lösen. Die untersuchten noch adhärenen Zellen waren tendenziell niedrig CEACAM20 exprimierend. Es waren jedoch auch hoch CEACAM20 exprimierende Zellen zu finden. Diese hätten sich möglicherweise noch zu einem späteren Zeitpunkt ablösen können. Der Anteil Propidiumjodid-positiver toter Zellen, in der Fraktion der abgeschwommenen Zellen war mit circa 15% deutlich höher als bei den adhärenen ebenfalls Doxyzyklin-behandelter CEACAM20-K9-Zellen (circa 5%). Der Anteil toter Zellen lag in der Negativkontrolle bei circa 3% (Abbildung 22 b).

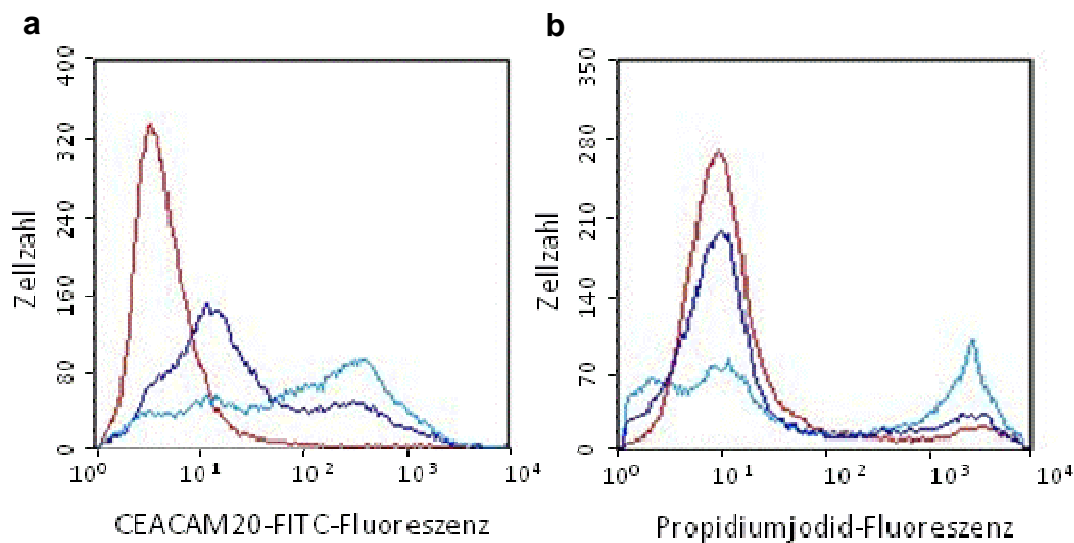


Abbildung 22: Selektiver Adhärenzverlustes CEACAM20-hochexprimierender HEK293T-Zellen. Die Induktion des Zellklons C20-K9 erfolgte für 48 h in Gegenwart von 1 µg/ml Doxyzyklin. Als Negativkontrolle diente derselbe Zellklon ohne Induktion. Die CEACAM20-Expression wurde durchflusszytometrisch mit dem Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 bestimmt (a). Tote Zellen wurden über die Aufnahme von Propidiumjodid quantifiziert (b). Die adhärenen Zellpopulation ist dunkelblau dargestellt, die Zellen mit Adhärenzverlust sind hellblau und die Negativkontrolle ist rot dargestellt.

4.2.3 Ist die ITAM-Konsensussequenz von CEACAM20 funktionell?

Die bisherigen Untersuchungen zur Funktion von CEACAM20 ergaben, dass CEACAM20-Expression zu einer Verminderung der Zellvitalität und Zellvermehrung führt (Abbildung 16). Ursache dafür könnte ein Adhärenzverlust CEACAM20-exprimierender Zellen sein (Abbildung 22). Überraschenderweise beobachteten wir eine ähnliche Beeinträchtigung der Zellvitalität und Zellvermehrung in einer CEACAM20-Mutante, bei der alle vier zytoplasmatischen Tyrosine in Phenylalaninen ausgetauscht wurden. Zwei der Tyrosine sind Teil eines phylogenetisch hochkonservierten ITAMs, ein Tyrosin ist Bestandteil eines ebenfalls hochkonservierten GRB2-ähnlichem SH2-Bindemotivs (Abbildung 4). Auf der anderen Seite schien sich der vitalitätshemmende Effekt durch CEACAM20 verstärkt in einer CEACAM20-Deletionsmutante ohne zytoplasmischer Domäne auszuwirken, so dass funktionsbeeinflussende Elemente im intrazellulären Bereich von CEACAM20 vermutet werden können. In einem ersten Schritt zum besseren Verständnis der Funktion der verschiedenen potentiellen Motive, sollte die Phosphorylierbarkeit der Tyrosine überprüft werden. Phosphorylierung der Tyrosinreste innerhalb von ITAMs durch Src-verwandte Kinasen stellt den ersten Schritt bei der Signaltransduktion durch ITAM-Motive dar (Lee et al., 2005). Weiterhin sollten Kandidatenproteine mittels Massenspektrometrie identifiziert werden, die an die zytoplasmatische Domäne von CEACAM20 binden und somit die Funktion von CEACAM20 beeinflussen können.

4.2.3.1 Können die zytoplasmatischen Tyrosine in CEACAM20 phosphoryliert werden?

ITAM-Tyrosinphosphorylierung durch Src-verwandte Kinasen kann nur erfolgen, wenn sie in einem bestimmten Sequenzkontext liegen (Reth, 1989). Um zu überprüfen, ob Tyrosine grundsätzlich phosphorylierbar sind, werden Zellen mit Pervanadat, einem breit wirksamen Phosphataseinhibitor behandelt. Dadurch wird das in einer Zelle vorhandene dynamische Gleichgewicht zwischen spontaner Tyrosin-Phosphorylierung und Tyrosin-Dephosphorylierung auf die Seite der phosphorylierten Tyrosinen verschoben. Phosphorylierte Tyrosine können dann mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper nachgewiesen werden.

Um die Phosphorylierbarkeit der vier verschiedenen Tyrosine im zytoplasmatischen Bereich des CEACAM20 zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen transient mit den verschiedenen pRTS-CEACAM20-Mutanten transfiziert und für 48 h mit Doxzyklin induziert. Nach Behandlung mit Pervanadat wurden sie lysiert. Es folgte eine Immunpräzipitation mit dem monoklonalen CEACAM20-spezifischen Antikörper 6G4A5. Im *Western blot* wurde dann mit Hilfe eines Phosphotyrosin (P-Tyr)-erkennenden Antikörpers die Phosphorylierung der CEACAM20-Mutanten überprüft (Abbildung 23). Wie in früheren Experimenten waren zwei CEACAM20-Spezies mit einem Molekulargewicht von ca. 90 und 75 kDa nach Transfektion mit pRTS-CEACAM20 (WT) zu sehen. Beide CEACAM20-Varianten enthalten also p-Tyr. Erwartungsgemäß waren keine Signale bei der CEACAM20-Mutante, in der alle Tyrosine gegen Phenylalanin ausgetauscht wurden (Y511, 536, 578, 589F), sowie bei der Δ Cyt-Mutante zu sehen. Diese dienten somit als Negativkontrolle. Man erkennt weiter, dass besonders bei Mutation von Tyrosin-536 in Phenylalanin (Y536F), aber auch bei Y578F die Banden stark abgeschwächt sind. Derselbe Effekt ist auch für die Doppelmutante Y578, 589F sichtbar. Somit scheinen die beiden Tyrosinreste Y536 und Y578 eine Priorität bei der Phosphorylierung zu besitzen. Insgesamt scheinen jedoch alle Tyrosine an der Phosphorylierung beteiligt zu sein. Dies zeigt sich besonders in der Doppelmutante Y511, 536F. Hier scheint wiederum Y511 weniger phosphoryliert zu werden als Y536.

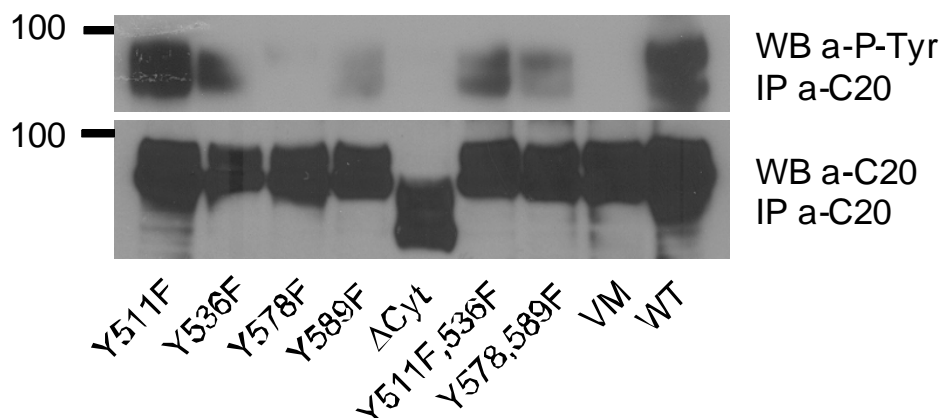


Abbildung 23: Phosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosine verschiedener CEACAM20-Mutanten. CEACAM20 wurde in Lysaten (je 100 μ g Protein) Doxzyklin-induzierter und Pervanadat-behandelter HEK293T-Transfektanten mit Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 immunpräzipitiert und im *Western blot* auf Anwesenheit von P-Tyr mit Hilfe eines Anti-P-Tyr-Antikörpers getestet. Nach Entfernung der Antikörper von der Membran wurde anschließend mit dem Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 gefärbt. Man erkannte, dass sich etwa gleich viel CEACAM20-Protein in jeder Probe befand. Die verminderte Größe der Δ Cyt-Mutante kam durch den fehlenden zytoplasmatischen Bereich zu Stande. WB= Western blot, IP= Immunpräzipitation, α -C20= Anti-CEACAM20-Antikörper (6G4A5), α -P-Tyr= Anti-Phosphotyrosin-Antikörper.

4.2.3.2 Quantifizierung von SYK-mRNA in humanen

Magenzelllinien mittels *real-time-PCR*

Es konnte bereits eine Interaktion von überexprimierten SYK und CEACAM20 durch Ko-Immunpräzipitation gezeigt werden (Paptistella, 2009). Deshalb sollte nun die Frage geklärt werden, ob in humanen Magenkarzinomzellen SYK für ITAM-vermitteltes *signalling* zur Verfügung stehen könnte. In einigen Proben ist viel SYK-mRNA vorhanden was auf eine Bedeutung als *Signalling*-Partner des CEACAM20-Rezeptors hinweist.

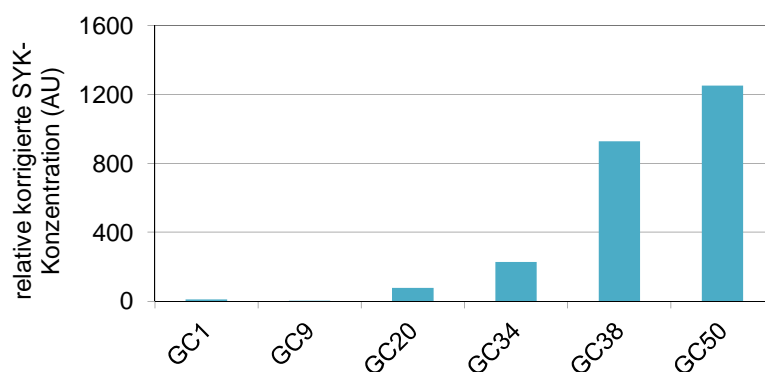


Abbildung 24: Quantifizierung von SYK-mRNA in humanen Magenkarzinomzelllinien. Es galten hierbei die gleichen Bedingungen für den quantitativen SYK-mRNA Nachweis und dieselben Qualitätskontrollen wie in Abbildung 12.

4.2.3.3 Identifizierung möglicher Bindepartner des

zytoplasmatischen Bereichs von CEACAM20 durch die

Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Methode der Massenspektrometrie sollten CEACAM20 assoziierte Proteine, die möglicherweise als *Downstream*-Partner an der Signaltransduktion beteiligt sind, identifiziert werden. Hierzu wurden in den stabilen Transfektanten C20-K9, C20-VM40 und C20- Δ Cyt-K125 mittels Doxyzyklin CEACAM20 überexprimiert. Nach Lyse der Zellen wurde CEACAM20 zusammen mit daran gebundenen Proteinen immunpräzipitiert, mittels eines Gradientengels aufgereinigt und ein *Western blot* durchgeführt um CEACAM20 nachzuweisen. Parallel hergestellte Gele wurden für die Massenspektrometrie präpariert (Kapitel 3.3.7).

Überraschenderweise, konnte nur in einer der Proben (C20VM-K40) CEACAM20 nachgewiesen und in keiner der Proben SYK detektiert werden. In beiden nicht mit Doxyzyklin induzierten Transfektanten, also in Abwesenheit von CEACAM20, wurden Enolase 1 (ENO1), Gehirn-Kreatinkinase (*creatin kinase, brain*; CKB), Herzmuskel-Aktin 1 (*actin, alpha, cardiac muscle 1*; ACTC1) sowie das Hitzeschockprotein 70 (*heat shock 70 kDa protein 8*) detektiert. Diese stellen somit unspezifisch gebundene Proteine dar. Im Vergleich der induzierten, Pervanadat-behandelten CEACAM20-Transfektante mit der gleichartig behandelten C20-ΔCyt-Transfektante wurden Peptide von Proteinen gefunden, welche für Motilität (*myosin, light chain 6B*; MYL6B), Proliferation, genau genommen für die Regulation des G2/M-Übergangs (*CDC5 cell division cycle 5-like*; CDC5L) -involviert in) und Stabilisierung des Aktin-Zytoskelett (TPM3; tropomyosin 3) verantwortlich sind (Kaneko-Kawano et al., 2012; Leonard et al., 2003; Gross, 2013). Auffällig ist hierbei, dass zwei (MYL6B, TPM3) der drei Peptide in der nicht mit Pervanadat-behandelten Probe (C20-K9 +D, -P) nicht detektierbar waren und somit möglicherweise phosphorylierungsabhängig mit CEACAM20 interagieren. Vergleicht man das Immunpräzipitat von Klon C20VM-K40 (mit und ohne Pervanadatbehandlung) mit dem von C20ΔCyt-K125-Zellen fallen Peptide auf, deren zugehörigen Proteine an der Unterdrückung von Metastasierung (NME1), Protein-Synthese (RPS16) und Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion (Galectin-7; LGALS7) beteiligt sind (Qu et al., 2008; Batra et al., 1991; Masuyer et al., 2012). Ebenso finden sich Peptide zweier Mitglieder der Tubulinfamilie sowie von Dolichyl-Diphosphooligosaccharid-Protein-Glycosyltransferase (DDOST), einem für die Glykosylphosphatidylinositolverankerung wichtigen Enzym. Peptide, die in der CEACAM20ΔCyt-Transfektante gefunden wurden, wurde angenommen, dass die korrespondierenden Proteine nicht an die zytoplasmatische Domäne binden können.

Tabelle 2: Analyse von CEACAM20-Proteinkomplexen mittels Massenspektrometrie. HEK293T-Transfektanten C20-K9, C20VM-K40 und C20ΔCyt-K125 wurden mit oder ohne Doxyzyklin für 2 Tage kultiviert, lysiert und CEACAM20 mit dem Anti-CEACAM20-Antikörper 6G4A5 immunpräzipitiert. Die im CEACAM20-Immunpräzipitat enthaltenen Proteine wurden auf einem Gradientengel der Größe nach aufgetrennt, das Gel in Laufrichtung fragmentiert und nach Proteaseverdau massenspektroskopisch analysiert. Die in den Gelstücken gefundenen Peptide sind nach absteigendem Molekulargewicht (MW) der zugehörigen Proteine geordnet. -D ohne Doxyzyklin-Zugabe; +D, mit Doxyzyklin-Vorbehandlung; -P, ohne, +P, mit Pervanadat-Zugabe. CEACAM20 ist hellblau markiert. Magentafarben sind die Proteine unterlegt, welche in nicht-induzierten Proben vorkommen, jedoch in keiner der Doxyzyklin-induzierten Proben. Grün unterlegt sind die Proteine, welche in der Doxyzyklin-induzierten Transfektante mit phosphorylierten CEACAM20 (C20-K9) detektiert werden konnten, nicht jedoch in der CEACAM20ΔCyt-Transfektante (C20ΔCyt). Dies diente dazu, jene Proteine zu identifizieren, welche möglicherweise an die zytoplasmatische Domäne binden können. Alle Proteine, die in Immunpräzipitaten von CEACAM20ΔCyt-Transfektanten gefunden wurden, können nicht an die zytoplasmatische Domäne gebunden haben und sind grau unterlegt. Gelb unterlegt sind Proteine, die in Abwesenheit von Tyrosinen an CEACAM20 binden können. ACTC1, *actin alpha cardiac muscle 1*; ATP5A, *ATP synthase subunit alpha (mitochondrial)*; CDC5L, *cell division cycle 5-like protein*; CKB, *creatine kinase B-type*; CSN1S1, *casein alpha s1*; DDOST, *dolichyl-diphosphooligosaccharide protein glycosyltransferase*; DSP, *desmoplakin*; EEF1A2, *elongation factor 1-alpha 2*; ENO1, *Enolase 1*; HSPD1, *Heat shock 60 kDa protein 1*; LGALS7, *Galectin-7*; MYL6B, *myosin light chain 6B*; NME1, *NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1*; PHB2, *Prohibitin-2*; PHGDH, *D-3-phosphoglycerate dehydrogenase*; RPS3, *40S ribosomal protein S3*; RPS16, *40S ribosomal protein S16*; SLC25A5P8, *solute carrier family 25 member 5 pseudogene 8*; SLC25A6, *solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6*; SAE1, *SUMO-activating enzyme subunit 1*; TFPCP, *transcription factor CP2-like 1*; TUBB2C, *tubulin beta-2C chain*; TUBB4, *tubulin beta-4 chain*; TUBA1A, *tubulin alpha-1A chain*; TPM3, *Tropomyosin 3*; TUFM, *Elongation factor Tu (mitochondrial)*; VDAC1/2, *voltage-dependent anion channels 1/2*.

MW kDa	C20VM- K40 (-D, - P)	C20VM- K40 (- D, +P)	C20-K9 (+D, -P)	C20-K9 (+D, +P)	C20VM- K40 (+D, - P)	C20VM- K40 (+D, + P)	C20ΔCyt -K125 (+D, -P)	C20ΔCyt- K125 (+D, +P)
350						DSP		
								HRNR DSP
100								HSPD1
75				ATP5A1				
	HSPA8					PHGDH CEACAM20	ATP5A1 PHGDH TFPCP2L1 TUBB2C	PHGDH
50			EEF1A2		DDOST TUBB2C TUBB4	TUBB2C		TUBA1A TUFM
	ENO1 CKB	ENO1 ACTC1 CKB		TPM3			SAE1	
37			SLC25A5P8	CDC5L				
25			CSN1S1			CSN1S1 SLC25A5P8 SLC25A6 RPS3 NME1	SLC25A6 PHB2 VDAC2 VDAC1 Alpha-S2- casein	SLC25A5P8 RPS3
20			CDC5L			RPS16 LGALS7	CSN1S1	
				MYL6B				

5 Diskussion

5.1 Überexpression von CEACAM20 führt in vitro zu Adhärenzverlust

Unter Induktion mit Doxyzyklin fiel bei beiden pRTS-C20-Wildtyp-Zellklonen eine Tendenz zum Adhärenzverlust auf. Je stärker CEACAM20 exprimiert wurde, desto weniger Zellen blieben adhären. Die abgelösten C20-WT-K9-Zellen exprimierten im FACS durchschnittlich mehr CEACAM20 als die adhären Zellen. Bei ersteren wurde ein erhöhter Anteil an toten Zellen nachgewiesen. Zunächst könnte eine Ursache für den Adhärenzverlust der Zellen die unphysiologisch hohe Expression von CEACAM20 sein und ein Artefakt darstellen. Dieses erscheint jedoch aufgrund eines vergleichbaren Adhärenzverlustes bei unterschiedlicher Höhe der CEACAM20-Expression der verschiedenen Mutanten eher unwahrscheinlich. Zudem wäre zu überlegen, ob die Expression des CEACAM20 einen Apoptosereiz darstellt und somit den Zelltod auslösen könnte. Katz et al. zeigten, dass das ITAM-haltige Env-Protein des *murine mammary tumor virus* in Brustepithelzellen eine Herunterregulierung von E-Cadherin, sowie Keratin-18 bewirkte und über TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) oder TNF α die Apoptosesensitivität erhöhte (Katz et al., 2005). Jedoch ist im Versuch ein Großteil der abgelösten Zellen vital, was wiederum gegen diese Vermutung spricht. Auch könnte durch CEACAM20-Expression ein pathologischer Adhärenzverlust der Zellen ausgelöst werden, wie dieser beispielsweise im Rahmen von Metastasierung stattfindet. Wie in Kapitel 1.3 ausführlicher beschrieben, zeigt bereits ein in nicht-hämatopoetischen Zellen eingebrachtes, ITAM-enthaltendes, rekombinant hergestelltes Protein Anzeichen einer Transition des epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp (EMT) und wirkt somit an sich als Onkoprotein. Wurden im ITAM-Bereich Tyrosine gegen Phenylalanine ausgetauscht oder die SYK-Tyrosinkinase gehemmt, konnte die Zelltransformation verhindert werden (Grande et al., 2006). Allerdings scheint beim CEACAM20-induzierten Adhärenzverlust ITAM-vermittelte Signaltransduktion keine Rolle zu spielen, da die CEACAM20-Mutante ohne zytoplasmatische Tyrosine ebenfalls einen Adhärenzverlust zeigte. Inwiefern diese Erkenntnisse auch für CEACAM20 zutreffen, sollte in der Zukunft durch Matrigel-Invasions- und Migrations-Assays überprüft werden. Untersucht werden könnte, ob sich die Zellen durch Expression von Wildtyp-CEACAM20 vermehrt ablösen, eine Membranbarriere durchdringen und nach Entfernung von Doxyzyklin wieder erneut adhären können.

Zudem sollte getestet werden, inwiefern sich die Ergebnisse bei Expression der CEACAM20-Mutanten hiervon unterscheiden.

5.2 Hemmung der Zell-Zell-Interaktion durch CEACAM20

Bei der Analyse des Zelladhäsionsverlustes nach CEACAM20-Induktion blieb allerdings unklar, ob eher die Zell-extrazelluläre-Matrix- oder die Zell-Zell-Interaktion gehemmt wird. R. Riesenberg führte in unserer Arbeitsgruppe hierzu einen richtungsweisenden Versuch durch. pRTS-C20WT-K9-Zellen wurden transient mit einem CEACAM16-GPI-Expressionsplasmid transfiziert. Dies erlaubt die Expression von membrangebundenem CEACAM16, das homophile Zell-Zelladhäsion vermittelt (Kammerer et al., 2012). Die Adhäsion wurde bei Expression von CEACAM20 gehemmt (persönliche Mitteilung). Dieses Phänomen unterscheidet CEACAM20 von den bekannten Funktionen der anderen CEA-Familienmitglieder. Eine Ursache hierfür könnte die N-Domäne darstellen, welche ausschließlich bei CEACAM20 in Säugern mit Plazenta (Eutheria) stark verkürzt ist. Bei CEACAM1 und anderen CEA-Familienmitgliedern ist die IgV-ähnliche terminale N-Domäne essentiell für die Ausbildung der homophilen und heterophilen Adhäsion (Watt et al., 2001). Interessanterweise besitzt die N-Domäne von CEACAM20 in Beuteltieren eine Größe, wie sie auch in anderen CEACAMs gefunden wird (W. Zimmermann, persönliche Mitteilung). Für weiterführende Untersuchungen wäre es daher interessant zu überprüfen, ob CEACAM20-Moleküle der Beuteltiere auch eine antiadhäsive Wirkung haben. Wie vermittelt nun CEACAM20 seine antiadhäsive Wirkung? CEACAM20 könnte in Zellen eine ähnliche Funktion wie Dysadherin besitzen. Die Überexpression von Dysadherin führte zu einer verringerten Zell-Zell-Adhäsion. Dabei zeigte sich eine Dosis-abhängige *Down*-Regulation von E-Cadherin (Ino et al., 2002). Die Expression von Dysadherin führte in Leberkrebszellen *in vitro* zu verringerter Zell-Zell-Adhäsion und erhöhte *in vivo* die Ausbildung von Metastasen (Ino et al., 2002). Im Einklang damit führte die Herunterregulierung von Dysadherin in Brustkrebszellen zu verringerter Metastasenbildung (Nam et al., 2006).

Gegenwärtig ist allerdings nicht geklärt, ob die CEACAM20-induzierte Zellablösung durch Herunterregulation von Zelladhäsionsmolekülen, wie im Falle von Dysadherin, oder durch eine direkte zell-abstoßende Wirkung vermittelt wird. Der in meinen Experimenten aufgefallene etwas erhöhte Anteil an apoptotischen Zellen in der Fraktion der abgelösten Zellen, könnte durch Anoikis bedingt sein. Anoikis ist eine

Unterform der Apoptose und findet statt, wenn Zellen sich aus ihrem epithelialen Zell-Matrix-Verband lösen und deswegen absterben (Frisch et al., 1996). Dies sollte in zukünftigen Versuchen durch einen Apoptosetest genauer untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, dass HEK293T-Zellen, die CEACAM20 ohne zytoplasmatischer Domäne exprimieren, vermehrt absterben. Es wäre möglich, dass der zytoplasmatische Bereich von CEACAM20 *Survival*-Signale liefert. Letztere könnten die Zellen vor Anoikis schützen und bewirken, dass diese auch teilweise in Suspension vital bleiben.

5.3 Funktionalität des ITAM-Motivs

Die hohe Konservierung der zytoplasmatischen ITAM-Konsensussequenz von CEACAM20 in verschiedenen Säugetierspezies legt die Vermutung nahe, dass diese eine essentielle Rolle im Organismus übernimmt. Durch Phosphorylierung der Tyrosinreste im ITAM durch die Src-Kinase könnte beispielsweise SYK über seine *Src-homology-2*-(SH2)-Domäne daran binden. Wie bei anderen ITAM-tragenden Rezeptoren der Fall, könnten Wachstum und Entwicklung durch Aktivierung *downstream* liegender Signaltransduktionswege gesteuert werden. Insofern erschien es wichtig festzustellen, ob das ITAM in CEACAM20 funktionell aktiv ist und welche Tyrosine im Sequenzmotiv für seine Funktion besonders wichtig sind. Außer den beiden Tyrosinresten des ITAMs (Tyr-578, Tyr-589), gibt es noch zwei weitere Tyrosine (Tyr-511; Tyr-536). Durch alternatives Spleißen von Exon 11 (Cyt 4 in Abb. 4) würde Tyr-536 in einem ITAM zu liegen kommen. Das andere Tyrosin liegt in einem potentiellen Motiv, das nach Phosphorylierung von der Grb2-SH2-Domäne oder verwandter Domänen gebunden werden könnte (Nioche *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde die grundsätzliche Funktionalität der einzelnen Tyrosinreste des ITAMs, sowie zwei weiterer Tyrosinreste in Phosphorylierungsstudien untersucht. Jedes der vier Tyrosine scheint phosphorylierbar zu sein. Eine Priorität in der Phosphorylierung besitzt der weiter N-terminal gelegene der beiden Tyrosinreste des ITAM, welches auf eine Funktionalität dieses Motivs hindeutet. In der Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors ist die Phosphorylierung beider ITAM-Tyrosine essentiell für die Liganden-induzierte Syk-Phosphorylierung. Jedoch war keines der Tyrosine essentiell für die Phosphorylierung der Src-Kinasen (Pao et al., 1998). Verschiedene Wirkungen können durch Mono-Phosphorylierung des ITAM-Motivs erreicht werden. ITAMs können somit sogar inhibitorische Funktionen übernehmen (Blank et al., 2009;

Waterman und Cambier, 2010). Auch im T-Zell-Rezeptor führt eine differentielle Phosphorylierung zu unterschiedlichen Effekten. Die Phosphorylierung beider Tyrosinreste des ITAM-Motives war wichtig für die hochaffine Bindung der Tyrosinkinase ZAP-70, während die alleinige Phosphorylierung des C-terminal gelegenen Tyrosinrestes zur Bindung des Shc-Adaptorproteins führte (Osman et al., 1995). ZAP-70 war essentiell für die Initiierung der T-Zell Antwort (Wang et al., 2010), während Shc beispielsweise die Zellmotilität beeinflusste (Marone et al., 2004). Somit zeigte sich die Phosphorylierung unterschiedlicher Tyrosine innerhalb des ITAM-Motivs für eine differentielle Aktivierung verschiedener Signalkaskaden verantwortlich und es ist vorstellbar, dass dies gleichermaßen auch für das ITAM-Motiv des CEACAM20 zutreffen könnte.

5.4 Mögliche ITAM-Funktion

Ursprünglich wurden ITAM-Motive in einer Vielzahl von Immunrezeptor-Komplexen in hämatopoetischen Zellen gefunden, wo sie Aktivierung, Differenzierung und Apoptose steuern (Wang et al., 2006). Zunehmend werden ITAM-enthaltende Proteine auch in Epithelzellen entdeckt. ITAMs scheinen in vielen Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen vertreten zu sein, wie in Strukturproteinen, Membrantransportern, Signaltransduktionsproteinen und Zelloberflächenrezeptoren (Fodor et al., 2006). Wie unerwartet ITAMs wirken können, zeigt sich darin, dass sogar eine Liganden-unabhängige Signalübermittlung möglich ist (Bannish et al., 2001; Roose et al., 2003). Für diesen Vorgang scheint nur die Verankerung des ITAM-tragenden Proteins in der Plasmamembran erforderlich (Monroe, 2004). Es wird angenommen, dass diese so genannte tonische Signaltransduktion durch inhibierende ITIM-enthaltende Korezeptoren kontrolliert wird zu sein (Monroe, 2006). Inzwischen wurden mehrfach ITAMs beschrieben, welche unter bestimmten Umständen Signaltransduktion aktivieren, bei anderen Bedingungen aber auch hemmen können. Dies zeigt die Flexibilität und Komplexität des ITAM-Systems (Underhill and Goodridge, 2007). Auch bei der ITAM-ähnlichen Sequenz im CagA-Protein des Bakteriums *Helicobacter pylori* wird vermutet, dass es über einen Src-Proteintyrosinkinase unabhängigen Signalweg über Wachstumsfaktoren an der Entstehung von Magenkarzinomen beteiligt sein könnte. Das ITAM-haltige Protein bindet vermutlich in vivo an die Lipiddoppelschicht, da es an der Lumenoberfläche der Foveolae des Magens gefunden wird (Asahi et al., 2003). Ähnliche

Färbungsmuster zeigten sich auch in meinen Experimenten der CEACAM20-Immunhistologie beim Magenkarzinom.

Einige Viren besitzen durch ihr zytoplasmatisches ITAM einen transformierenden Effekt, wie beispielsweise das Kaposisarkom-assoziierte Herpesvirus-K1-Protein in Endothelzellen, das Epstein-Barr-Virus-LMPA2 (*latent membrane protein 2A*) in Fibroblasten und das *mouse mammary tumor virus* env gp52 in Brustzellen (Wang et al., 2006; Fruehling und Longnecker, 1997; Merchant et al., 2000; Ross et al., 2006). Das ITAM-enhaltende LMPA2 (*latent membrane protein 2A*) wird in EBV-assoziierten epithelialen Tumoren wie Nasopharynx- und Magenkarzinomen exprimiert (Morrison et al., 2005). Das ITAM- und die Prolin-reichen Motive (PY-Motive) des LMP2A-Proteins sind an Signaltransduktionswegen mit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/AKT und β -Catenin in Epithelzellen beteiligt. Das ITAM ist hier wesentlich an der Aktivierung von AKT beteiligt, während für die Akkumulierung und Kerntranslokation des Onkoproteins β -Catenin sowohl ITAM als auch Prolin-reiche Motive benötigt werden (Morrison und Raab-Traub, 2005). Im Kern interagiert β -Catenin mit Mitgliedern der *lymphoid enhancing factor family* (LEF-1), welche Gene wie *c-MYC* und *CCND1* (*cyclin D1*) aktivieren. Diese steigern den Ablauf des Zellzyklus und die Zellproliferation (Shtutman et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999; Wong and Pignatelli, 2002; Giles et al., 2003). Außerdem übernimmt β -Catenin durch Interaktion mit E-Cadherin auch eine zentrale Zell-Zell-Adhäsion fördernde Funktion (Barker and Clevers, 2000; Shively et al., 2004; Gooding et al., 2004). Durch Verlust der zytoplasmatischen Domäne in der von mir hergestellten CEACAM20- Δ Cyt-Mutante und dem daraus folgenden gestörten Signaltransduktionswegs könnte es zu einer nochmals verringerten Synthese von β -Catenin kommen, welche den gesteigerten Verlust der Zell-Adhäsion in meinen Experimenten erklären könnte. Zusammenfassend könnte somit der ITAM-enhaltende zytoplasmatische Bereich von CEACAM20 durchaus an Zell-Adhäsion, Proliferation und Differenzierung beteiligt sein. Dies sind alles Funktionen, die zur Karzinogenese des Magens und anderen Organen beitragen.

5.5 Identifizierung möglicher *Downstream*-Partner von CEACAM20

In vorausgegangenen Versuchen konnte durch Koimmunpräzipitation von SYK und CEACAM20 eine Interaktion der beiden Proteine bei Überexpression gezeigt werden (Papistella, 2009). SYK ist in einer Vielzahl von Zellen an der Signaltransduktion,

wie beispielsweise in hämatopoetischen Zellen, Epithelzellen, Fibroblasten und Gefäßendothelzellen beteiligt (Yanagi et al., 2001). Eine vermehrte SYK-Expression in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs bewirkte eine erhöhte Migrations- und Invasionstendenz von Tumoren (Luangdilok et al., 2007). Eine gegenteilige, jedoch entscheidende Rolle scheint SYK auch in der Magenkarzinom-Entstehung zu spielen. Im Gegensatz zu Magengewebe zeigten einige Magenkarzinome eine verminderte SYK-Expression, verbunden mit Hypermethylierung des SYK-Gen-Promotors. Methylierung von SYK korrelierte mit der Onkogenese und Metastasierung. SYK scheint somit ein potenter Regulator des Epithelzellwachstums zu sein (Wang et al., 2004). In Magen- und Brustgewebe (Kapitel 1.3) übernimmt SYK somit die Funktion eines Tumorsuppressors (Coopmann et al, 2000, Wang et al., 2004). Zusammenfassend ist SYK nachweislich bei der Entstehung von Tumoren beteiligt und kann wie in Kapitel 5.3 beschrieben an ITAM binden. Syk könnte somit durchaus ein potentieller *Downstream*-Partner von dem ITAM-enthaltenden CEACAM20 sein. Es galt dies mit Hilfe der Methode der Massenspektrometrie ohne Überexpression potentieller Bindepartner näher zu untersuchen. Zudem sollte durch meine Experimente geklärt werden, ob noch weitere *Downstream*-Partner in Frage kommen. Hierzu wurden CEACAM20-assoziierte Proteine nach Immunpräzipitation von Lysaten der stabilen C20-K9-, C20-VM40- und C20- Δ Cyt-Transfektanten mittels Massenspektrometrie analysiert. SYK konnte, wider Erwarten, nicht in Immunpräzipitaten aus C20-VM40- und C20- Δ Cyt-Transfektantenlysaten gefunden werden. Überraschenderweise wurde SYK auch nicht in der Wildtyp-CEACAM20-exprimierenden Transfektante nach Pervanadatbehandlung gefunden. Eine *NCBI Geo Profiles* Analyse zeigte allerdings, dass SYK in HEK293T-Zellen nachgewiesen werden konnte und somit SYK für die Interaktion zur Verfügung stehen sollte. Eventuell ist die Methode der Massenspektrometrie zwar spezifisch, aber möglicherweise nicht sensitiv genug. Selbst CEACAM20 wurde nur in einer der sechs mit Hilfe der Massenspektrometrie untersuchten CEACAM20-Immunpräzipitaten aus Doxyzyklin-induzierten Transfektanten detektiert, obwohl im *Western blot* ausreichend CEACAM20-Protein nachgewiesen werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Erklärung hierfür ist, dass stark glykosylierte Proteine wie CEACAM20 nur ungenügend durch Trypsin verdaut werden und folglich geeignete Peptide zum Nachweis in der Massenspektrometrie nicht ausreichend zur Verfügung stehen. In Zukunft sollten

weitere Versuche zur Bestätigung einer Interaktion von SYK mit CEACAM20 durchgeführt werden. Beispielweise könnte eine Kotransfektion von SYK-Expressionsplasmiden mit den CEACAM20-Mutanten in HEK293T-Zellen erfolgen, mit anschließender Immunpräzipitation mit CEACAM20-Antikörpern und Nachweis im *Western blot*. Hierbei dürfte SYK nach bisherigen Erkenntnissen weder an die CEACAM20-Deletionsmutante (Δ Cyt), noch an CEACAM20 ohne Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne (VM) binden. Auch für die Detektion weiterer Signaltransduktionspartner erscheinen weitere Versuche sinnvoll.

5.6 Prolin-reiche Motive in der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM20 können an der Regulation der Zelladhäsion beteiligt sein

Bei Überexpression von CEACAM20 fielen in meinen Experimenten Adhärenzverlust der Zellen, sowie verlangsamte Zellvermehrung auf. Diese Effekte blieben trotz Austausch aller Tyrosine in der zytoplasmatischen Domäne gegen Phenylalanine unverändert. Folglich scheinen weder ITAM, noch die Grb2-bindende Domäne daran beteiligt zu sein, für deren Funktionalität die Anwesenheit von Tyrosinen an Konsensuspositionen unverzichtbar ist. Dagegen konnte der Prozentsatz nicht adhärenter Zellen verbunden mit einem stark erhöhten Verlust der Vitalität durch Deletion des gesamten zytoplasmatischen Bereichs weiter gesteigert werden. Daher führte ich eine Motiv-Recherche in einer Datenbank durch, die eine Sammlung von eukariotischen linearen Proteinsequenzmotiven enthält (*Database of Eukaryotic Linear Motifs* [ELM]), um weitere potentiell funktionell relevante Molekülbereiche zu identifizieren. Es zeigte sich, dass CEACAM20 im zytosolischen Bereich mehrere Prolin-reiche Motive besitzt (Abbildung 28). An diese können sich die Klasse-I-EVH1-Domänen (*enabled/VASP homology 1* oder *WASP homology 1 domains*), sowie SH2- und SH3-Domänen mit einer nicht-kanonischen Klasse-I-Erkennungsspezifität binden. Ein Beispiel für EVH1-Domänen tragende Proteine ist die Familie der N-WASP (*Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein*). Diese regulieren die fokalen Adhäsionsproteine Vinculin und Zyxin (Holt et al., 2001) und die Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts (Symons et al., 1996). Zudem stellt N-WASP eine Cadherin-abhängige Komponente der *Zonula adherens* dar, welche der Stabilisierung des junktionalen Zytoskeletts in Epithelzellen dient und die Integrität der *Zonula adherens*

wahrt (Kovacs et al., 2011). Ebenfalls ist Ena/VASP (*Drosophila Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein*) beispielsweise für die Regulierung der Ansammlung von Aktin-Filamenten verantwortlich (Renfranz und Beckerle, 2002). EVH1-Domänenhaltige Proteine haben folglich adhäsionsvermittelnde Eigenschaften und binden an die prolinreiche Region in der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM20.

Ein Verlust der prolinreichen Sequenzmotive in der CEACAM20-ΔCyt-Mutante könnte daher eine mögliche Erklärung für die nochmalige Steigerung des Adhärenzverlustes durch Überexpression (möglicherweise des extrazellulären Bereichs) von CEACAM20 sein.

Im Vergleich der Sequenzen verschiedener Spezies zeigt sich, dass ein prolinreiches Motiv (PxK) in allen untersuchten Spezies hochkonserviert und ein prolinreiches Motiv, welches SH3-Domänen (LIG_SH3_4), als auch Class-I-EVH1-Domänen binden kann innerhalb der untersuchten *Anthropoidea* konserviert ist (Abbildung 28).

	Cyt4	Cyt5
Bta_CEACAM20Cyt	QLSPPTSHSRYSHGPRKP-----SSNPLVPTPQKENAESNYEALVNPEHSIYCQINRST	
Ssc_CEACAM20Cyt	KESSAVHGGYSRGRKPQPK--LASDPSVTLP-KGNTESNYEVLVNPEHNLCHINSSV	
Cfa_CEACAM20Cyt	KDPPSTASGYCHGRKPSST--VALDPLVPTLPKGNTESDYEVLVNPEQNIYCQINPSV	
Fca_CEACAM20Cyt	KEPPSVTPGNDSHGRKSLPE--VTLDPLVPTLPKGNAESRYEVLVNPERNIYQGIDPSV	
Ggo_CEACAM20Cyt	TKLPSASRGGNSFSPWKPPPKPLMPFRLVSTVVPK-NMESIYEELVNPEPNTYIQINPSV	
Ppa_CEACAM20Cyt	TKLPSASRGGNSFSPWKPPPKPLMPFRLVSTVVPK-NMESIYEELVNPEPNTYIQINPSV	
Ptr_CEACAM20Cyt	TKLPSASRGGNSFSPWKPPPKPLMPFRLVSTVVPK-NMESIYEELVNPEPNTYIQINPSV	
Hsa_CEACAM20Cyt	TKLPSASRGGNSFSPWKPPPKPLMPPLRLVSTVVPK-NMESIYEELVNPEPNTYIQINPSV	
Ppy_CEACAM20Cyt	TKLPSASPGGNSFSPWKPPPKPLMPPLRLVSTVVPK-NMESIYEELVNPEPNTYIQINPSV	
Mml_CEACAM20Cyt	TKLPSASPGGNSFSPWKPPPKPLMPPLRLVSTVVPK-NTESIYEELVNPEPNTYVQINSLV	
Pan_CEACAM20Cyt	TKLPSASPGGNSFSPWKPPPKPLMPPLRLVSTVVPK-NTESIYEELVNPEPNTYVQINSSV	
Cja_CEACAM20Cyt	MKLPSESPGGNSFSPCKPPPKALMPPLRLLSIRPKSNMESIYEELVNPEPNTYTQINPSV	
Sbo_CEACAM20Cyt	TQLPSESPGGNSFSPWKPPPKALMPPLRLVSTHPSKNMESIYEELVNPEPNTYAQINPSV	
Mmu_CEACAM20Cyt	KKPPSAAPE----GPRKPLPQ--IPKQPLMPGPGRNEESNYEKLNSNHSLYCKITPSA	
Rno_CEACAM20Cyt	KKPPSAAPE----GPRKPLPR-IPKQPLVPPVPNRNKNESNYEALLNPNQSLYCKINPSV	
	LIG_SH3_3,4; LIG_EVH1_1	
	(Motive unterstrichen)	
	Prolin-reiche Motive	

Abbildung 28: Konservierung einer prolinreichen Signaltransduktionssequenz in der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM20 in verschiedenen Spezies. Ausschnitt aus dem zytoplasmatischen Bereichs des CEACAM20. Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode angegeben. Rot gedruckt sind Aminosäuren der Prolin-reichen Motive (PxK), die in allen Spezies identisch sind. Relativ gut konservierte Aminosäuren sind Blau dargesellt, während schwarze Aminosäuren in den einzelnen Spezies unterschiedlich sind. Innerhalb der Anthropoidea (Affen) zeigt sich ein prolinreiches Motiv (unterstrichen) konserviert, welches sich an verschiedenen SH3-Domänen (LIG_SH3_4), als auch Class-I-EVH1-Domänen binden kann. Unterhalb der verglichenen Sequenzen sind die Konsensussequenzen angegeben. Bta, *Bos taurus* (Rind); Ssc, *Sus scrofa* (Wildschwein); Cfa, *Canis familiaris* (Hund); Fca, *Felis catus* (Katze); Ggo, *Gorilla gorilla* (Westlicher Gorilla); Ppa, *Papio papio* (Guinea-pavian); Ptr, *Pan troglodytes* (Schimpanse); Hsa, *Homo sapiens* (Mensch); Ppy, *Pongo pygmaeus* (Orang-Utan); Mml, *Macaca mulatta* (Rhesusaffe); Ppa, *Papio anubis* (Anubispavian); Cja, *Callithrix jacchus* (Weißbüscheläffchen); Sbo, *Saimiri boliviensis* (Bolivianischer Totenkopffaffe); Mmu, *Mus musculus* (Maus); Rno, *Rattus norvegicus* (Ratte).

5.7 Ist CEACAM 3 mit seinem ITAM oder CEACAM1 mit seinem inhibitorischen ITIM-Motiv ein Kooperationspartner von CEACAM20?

Über die Funktion der ITAM-tragenden Familienmitglieder (CEACAM3, CEACAM4, CEACAM19, CEACAM20) bei der Tumorentstehung sind in der Literatur bisher kaum Daten bekannt. Großes Interesse und zahlreiche Literatur ist über das CEACAM1 zu finden, welches ein ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motive*) trägt. Ebenso wie CEACAM20 wird CEACAM1 in Epithelzellen verschiedenster Organe ko-exprimiert, wie beispielsweise in adultem Prostatanormalgewebe. Auch ist CEACAM20 gleichartig wie CEACAM1 in Prostatakarzinomgewebe herunterreguliert (Zhang et al., 2012). Einerseits fungiert CEACAM1 in einigen Epithelzellen als Tumorsuppressors, wie beispielsweise in Brust, Prostata, Kolon und Blase (Brümmer et al., 1995; Kleinerman et al., 1996; Luo et al. 1997; Luo et al. 1999; Estrera et al., 2001). Andererseits korreliert der CEACAM1-Gehalt in malignen Melanomen proportional mit Invasivität und geringerer Überlebenszeit der Patienten (Ebrahimnejad et al., 2004; Markel et al., 2009). In Schilddrüsenkrebs scheint die Hochregulation von CEACAM1 das Tumorwachstum zu verlangsamen, während es gleichzeitig die Invasivität fördert (Lui et al, 2007). Ähnliche Effekte wurden auch im Magenadenokarzinom beobachtet (Kingusa et al., 1998), wo eine hohe CEACAM1-Expression mit Lymphknotenmetastasierung korreliert (Zhou et al., 2009). CEACAM1 kommt natürlicher Weise in verschiedenen Isoformen vor. Im Vergleich zu CEACAM1-4L ist der zytosolische Bereich von CEACAM1-4S auf zehn Aminosäuren verkürzt und das ITIM fehlt, die extrazellulären Domänen stimmen jedoch überein (Barnett et al. 1989; Öbrink, 1997). Für die Tumor-supprimierende Wirkung ist unter anderem das ITIM im CEACAM1-L mit verantwortlich (Fournès et al., 2001). Im Gegensatz zu CEACAM1-S ist CEACAM1-L zudem mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert (Sadekova et al., 2000). Durch die genannte Assoziation und die homophile CEACAM1-CEACAM1 Interaktion entstehen interzelluläre Kontakte. Am Beispiel des CEACAM1 erkennt man, wie Komplex ein einzelner Rezeptor mit verschiedenen Ko-Faktoren wirken kann.

CEACAM3 enthält im zytosolischen Bereich neben einer ITAM-ähnliche Sequenz auch ein kurzes Prolin-reiches Motiv (Pils et al., 2008). Es wird ausschließlich auf Granulozyten exprimiert und ist für die effiziente Internalisierung von Neisseria,

Moraxella und Haemophilus species mittels ITAM zuständig (Billker et al., 2002; Chen and Gotschlich, 1996; Schmitter et al., 2004). Hierzu werden die Tyrosinreste des ITAM über Src-Proteintyrosinkinasen phosphoryliert und der *Downstream*-Partner SYK aktiviert. Die Koexpression von CEACAM1, sowie CEACAM6 mit CEACAM3 potenzierte die Reaktion der Granulozyten auf Neisserieninfektionen (Sarantis and Gray-Owen, 2012). Dies deutet wiederum auf Kooperation innerhalb der CEACAM-Familie hin. Solche Paare ITIM- und ITAM-tragender Rezeptoren, sind u.a. im Immunsystem gut bekannt. Ein solches Paar bestehend aus PD-1 mit einem ITIM-verwandten Motiv und den ITAM-tragenden CD3/ζ-Ketten-Komplex sind für regulierte T-Zellaktivierung wichtig (Parry et al., 2005). Zukünftig sollte geklärt werden, ob CEACAM1 und CEACAM20 mit ihrem ITIM- bzw. ITAM-Motiv zusammen exprimiert werden und funktionell interagieren. Kandidatengewebe u.a. stellen Dünndarmepithel dar, für die wir Expression von CEACAM1 und CEACAM20 belegen konnten (Papistella, 2009).

5.8 Expression und Funktion von CEACAM20 in humanem Gewebe

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, in welchen Geweben CEACAM20 vorkommt und inwiefern die *in vitro* beobachtete Funktion *in vivo* relevant sein könnte. Durch Vorarbeiten war bereits bekannt, dass sowohl Dünndarm-, Prostata- und Prostatakarzinomgewebe, als auch Kolonkarzinom- und Prostatakarzinomzelllinien CEACAM20 exprimieren (Papistella, 2009; Eisenried, 2010). Beim Vergleich der CEACAM20-Expressionsorte von Mensch und Maus ergaben sich nur vereinzelte Unterschiede. Zebhauser et al. (2005) konnte murine Ceacam20-mRNA in Magenkarzinomgewebe, nicht jedoch in Magennormalgewebe der Maus nachweisen. In dieser Arbeit sollte insbesondere die Expression von CEACAM20 in Magenkarzinomgewebe und -zellen des Menschen, als weiteren Teil des gastrointestinalen Systems, geklärt werden. Im Vergleich von humanem Magenkarzinomgewebe mit entsprechendem Normalgewebe wurden in drei von vier Fällen geringere CEACAM20-mRNA-Konzentrationen im Karzinomgewebe gefunden. Auch erfolgte eine quantitative Expressionsanalyse von sechs humanen Magenkarzinomzelllinien. Die Magenkarzinomzellen wiesen in meinen Experimenten durchweg wenig CEACAM20-mRNA auf. Immunhistologische Färbungen an Paraffinschnitten von humanen Magenkarzinomgeweben mit murinen polyklonalen CEACAM20-Antikörpern zeigte eine apikale Färbung des Epithels. Diese zeigte eine

Ähnlichkeit mit dem bereits bekannten Färbungsmuster von Dünndarmnormalgewebe, das auch auf mRNA-Ebene durch in situ Hybridisierung bestätigt werden konnte (S. Hammarström, persönliche Mitteilung; Paptistella, 2009). In zukünftigen Versuchen sollte der Nachweis des CEACAM20-Proteins aus Gewebelysaten im *Western blot* erfolgen. In Vorarbeiten blieb dies jedoch erfolglos und ist wahrscheinlich darin begründet, dass die Methode des *Western blots* nicht sensitiv genug für den Nachweis des CEACAM20-Proteins in den Gewebelysaten war. Eine vorgeschaltete Immunpräzipitation mit einem anti-CEACAM20-Antikörper könnte die Empfindlichkeit steigern. Zusammenfassend erfolgte die CEACAM20-Expression in sich rasch erneuernden Epithelien von Dünndarm-, Prostata- und Magengewebe. Somit ist vorstellbar, dass CEACAM20 durch seine Anti-Adhäsionsfunktion bei der Ablösung verbrauchter Epithelzellen helfen könnte.

Weiterhin konnten auch in murinem Hodengewebe durch RT-PCR CEACAM20-mRNA nachgewiesen werden (Zebhauser et al., 2005). In immunhistologischen Färbungen von Hodengewebe des Menschen mit monoklonalen CEACAM20-Antikörpern zeigte sich eine spezifische intrazelluläre Färbung der Leydig-Zellen (Riesenberg, persönliche Mitteilung). Die erwähnten Zellen sind für die Testosteronsynthese zuständig, welches für die Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale und die Spermienbildung verantwortlich sind. Auch im murinen Ovar, wurden Ceacam20-Transkripte detektiert. In *NCBI Geo Profiles* ist in verschiedenen Reifestadien der murinen Oogenese ein Anstieg der Ceacam20-mRNA zu verzeichnen. Auch nach Befruchtung der Oozyte steigert sich die Ceacam20-Genexpression erneut und erreicht sein Maximum im Einzellstadium des Embryos, um danach in den folgenden Zellstadien abzufallen (Pan et al., 2005; Zeng et al., 2004). Es wäre denkbar, dass CEACAM20 an der Reifung als auch der Befruchtung der Eizelle beteiligt sein könnte. Um den Wirkort einzugrenzen, wurde CEACAM20 in humanen Gewebeschnitten des Ovars mit monoklonalen und polyklonalen CEACAM20-Antikörpern detektiert. Es zeigte sich in meinen Experimenten eine Färbung der *Zona pellucida*. Ebenfalls in der *Zona pellucida* wird der Zellmembranrezeptor CD9 exprimiert. Bisher konnte er in Säugetieren (Maus, Schwein) nachgewiesen werden (Li et al. 2004; Komorowski et al., 2006). CD9 ist wahrscheinlich für die Befruchtung der Eizelle mit einem Spermium verantwortlich (Le Naour et al., 2000). Der dazugehörige Ligand in der Maus ist das lösliche PSG17, welches ebenfalls der CEA-Familie angehört (Waterhouse et al., 2002). CD9

interagiert durch die lange, extrazelluläre N-Domäne mit sich selbst, aber auch mit Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie (Levy and Shoham, 2005). Es wäre somit denkbar, dass CD9 die Funktion des Korezeptor von CEACAM20 übernehmen könnte. Gleichmaßen könnte CEACAM20 durch seinen Anti-Adhäsionseffekt bei dem Ausstoß der reifenden Eizelle aus dem Follikelepithel beteiligt sein.

Auch scheint CEACAM20 in der Morphogenese von Drüsengewebe eine bedeutende Rolle zu spielen. Im Prostatanormalgewebe war CEACAM20 ausschließlich in den sphärischen Aznini und im Lumen nachweisbar. Der *knock-down* von CEACAM20 mit antisense Oligonukleotiden führte zur Inhibition der Tubuli-Ausbildung und zu signifikant kleiner ausgebildeten Azini. CEACAM1 scheint vor allem bei der tubulären Differenzierung eine Rolle zu spielen. In Prostatakarzinomen mit hohem Gleason score könnte folglich die Herrunterregulierung von CEACAM1 und/oder CEACAM20 für die Abwesenheit von Lumina ursächlich sein (Zhang et al., 2013). Es ist gut vorstellbar, dass diese Funktion ebenfalls auf das Magenkarzinom übertragbar ist. Einerseits war in meinen Experimenten CEACAM20 hier ebenfalls im apikalen Bereich der Epithelzellen nachweisbar. Eines der Magenkarzinome verliert sogar die apikale CEACAM20-Färbung in dem Bereich, in welchen es in ein entdifferenzierteres Karzinom übergeht. Andererseits zeigten 3 von 4 Magenkarzinomen eine Herrunterregulierung der CEACAM20-mRNA im Vergleich zu entsprechendem Magennormalgewebe. Insofern ist gut vorstellbar, dass CEACAM20 in der Morphogenese des Magendrüsengewebes eine bedeutende Rolle spielen könnte und durch seinen anti-adhäsiven Effekt einerseits der Epithelerneuerung dienen, aber im Karzinom die Ausbildung von Metastasen fördern könnte.

6 Zusammenfassung

Bis heute stellen Tumore die zweithäufigste Todesursache dar und die Früherkennung, als auch die Patienten individualisierte Therapie werden immer wichtiger. Deshalb rücken insbesondere Tumormarker ins Interesse der Forschung. Zu diesen könnte ebenfalls CEACAM20 zählen. Es sollte geklärt werden inwiefern CEACAM20 bei der Entstehung und Progression epithelialer Tumore beteiligt sein könnte. Hierfür bedienten wir uns funktioneller Analysen eines stabil-transfizierten, induzierbaren Expressionsvektors und der ELM-Motiv Recherche. In der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM20 befindet sich eine *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) Konsensussequenz. In Epithelzellen kann bereits die Überexpression eines rekombinant hergestellten ITAM-haltigen Proteins an sich als Onkoprotein wirken. Auch einige Viren bewirken über ITAM-haltige Proteine einen transformierenden Effekt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass präferentiell die Tyrosinreste des ITAM phosphoryliert werden und somit dieses Motiv wahrscheinlich funktionell aktiv ist. Neben dem ITAM scheinen auch andere Domänen des zytoplasmatischen Bereichs essentielle Regulationsmechanismen zu steuern. Die in CEACAM20 vorhandenen Prolin-reichen Motive, von denen in anderen Proteinen bekannt ist, dass sie eine Rolle in der fokalen Adhäsion spielen, könnten die (anti)adhäsiven Eigenschaften CEACAM20 modulieren, was bei Funktionsverlust zu Anoikis führen könnte. Dafür spricht, dass ihr Verlust in der CEACAM20-Mutante ohne zytoplasmatische Domäne zu einer im Vergleich zur Mutante ohne zytoplasmatische Tyrosine zu verminderter Vitalität führte.

Zudem sollte geklärt werden, in welchen Organen die CEACAM20-Expression eine Rolle spielt. CEACAM20 zeigt ein breites Expressionsspektrum und konnte in rasch wachsenden Epithelnormalgeweben wie Dünndarm, Prostata und Magen nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde insbesondere die Expression von CEACAM20 in Magenkarzinomgewebe und Magennormalgewebe verglichen.

Die in vitro nachgewiesene Anti-Adhäsionsfunktion könnte in diesen Geweben bei physiologischer Ablösung verbrauchter Epithelzellen helfen und in Karzinomen durch Förderung der Zellmobilität und durch eine mögliche Überleben- und Wachstumsverstärkende Wirkung seines ITAM-Motivs Tumorwachstum und Tumorprogression unterstützen.

7 Literaturverzeichnis

Alberts, S.R., Sargent, D.J., Nair, S., Mahoney, M.R., Mooney, M., Thibodeau, S.N., Smyrk, T.C., Sinicrope, F.A., Chan, E., Gill, S., *et al.* (2012). Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 307, 1383-1393.

Allard, W.J., Neaman, I.E., Elting, J.J., Barnett, T.R., Yoshimura, H., Fritsche, H.A., and Yeung, K.K. (1994). Nonspecific cross-reacting antigen 50/90 is elevated in patients with breast, lung, and colon cancer. *Cancer research* 54, 1227-1234.

Aoki, Y., Kim, Y.T., Stillwell, R., Kim, T.J., and Pillai, S. (1995). The SH2 domains of Src family kinases associate with Syk. *The Journal of biological chemistry* 270, 15658-15663.

Asahi, M., Tanaka, Y., Izumi, T., Ito, Y., Naiki, H., Kersulyte, D., Tsujikawa, K., Saito, M., Sada, K., Yanagi, S., *et al.* (2003). *Helicobacter pylori* CagA containing ITAM-like sequences localized to lipid rafts negatively regulates VacA-induced signaling in vivo. *Helicobacter* 8, 1-14.

Ballesta, A.M., Molina, R., Filella, X., Jo, J., and Gimenez, N. (1995). Carcinoembryonic antigen in staging and follow-up of patients with solid tumors. *Tumour Biol* 16, 32-41.

Bannish, G., Fuentes-Panana, E.M., Cambier, J.C., Pear, W.S., and Monroe, J.G. (2001). Ligand-independent signaling functions for the B lymphocyte antigen receptor and their role in positive selection during B lymphopoiesis. *The Journal of experimental medicine* 194, 1583-1596.

Baranov, V., Yeung, M.M., and Hammarstrom, S. (1994). Expression of carcinoembryonic antigen and nonspecific cross-reacting 50-kDa antigen in human normal and cancerous colon mucosa: comparative ultrastructural study with monoclonal antibodies. *Cancer research* 54, 3305-3314.

Barker, N., and Clevers, H. (2000). Catenins, Wnt signaling and cancer. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22, 961-965.

Barnett, T.R., Kretschmer, A., Austen, D.A., Goebel, S.J., Hart, J.T., Elting, J.J., and Kamarck, M.E. (1989). Carcinoembryonic antigens: alternative splicing accounts for the multiple mRNAs that code for novel members of the carcinoembryonic antigen family. *The Journal of cell biology* 108, 267-276.

Batra, S.K., Metzgar, R.S., and Hollingsworth, M.A. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of the human ribosomal protein S16. *The Journal of biological chemistry* 266, 6830-6833.

Beauchemin, N., Draber, P., Dveksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., Hammarstrom, S., Holmes, K.V., Karlsson, A., Kuroki, M., *et al.* (1999). Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Experimental cell research* 252, 243-249.

Beauchemin, N., Kunath, T., Robitaille, J., Chow, B., Turbide, C., Daniels, E., and Veillette, A. (1997). Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene* 14, 783-790.

- Billker, O., Popp, A., Brinkmann, V., Wenig, G., Schneider, J., Caron, E., and Meyer, T.F. (2002). Distinct mechanisms of internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by members of the CEACAM receptor family involving Rac1- and Cdc42-dependent and -independent pathways. *The EMBO journal* 21, 560-571.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.
- Blank, U., Launay, P., Benhamou, M., and Monteiro, R.C. (2009). Inhibitory ITAMs as novel regulators of immunity. *Immunological reviews* 232, 59-71.
- Blumenthal, R.D., Hansen, H.J., and Goldenberg, D.M. (2005a). Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen). *Cancer research* 65, 8809-8817.
- Blumenthal, R.D., Osorio, L., Hayes, M.K., Horak, I.D., Hansen, H.J., and Goldenberg, D.M. (2005b). Carcinoembryonic antigen antibody inhibits lung metastasis and augments chemotherapy in a human colonic carcinoma xenograft. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 54, 315-327.
- Boehm, M.K., Mayans, M.O., Thornton, J.D., Begent, R.H., Keep, P.A., and Perkins, S.J. (1996). Extended glycoprotein structure of the seven domains in human carcinoembryonic antigen by X-ray and neutron solution scattering and an automated curve fitting procedure: implications for cellular adhesion. *Journal of molecular biology* 259, 718-736.
- Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., *et al.* (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic acids research* 33, e137.
- Bos, M.P., Hogan, D., and Belland, R.J. (1999). Homologue scanning mutagenesis reveals CD66 receptor residues required for neisserial Opa protein binding. *The Journal of experimental medicine* 190, 331-340.
- Bradley, C.J., Griffiths, N.J., Rowe, H.A., Heyderman, R.S., and Virji, M. (2005). Critical determinants of the interactions of capsule-expressing *Neisseria meningitidis* with host cells: the role of receptor density in increased cellular targeting via the outer membrane Opa proteins. *Cellular microbiology* 7, 1490-1503.
- Brummer, J., Neumaier, M., Gopfert, C., and Wagener, C. (1995). Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* 11, 1649-1655.
- Buntru, A., Kopp, K., Voges, M., Frank, R., Bachmann, V., and Hauck, C.R. (2011). Phosphatidylinositol 3'-kinase activity is critical for initiating the oxidative burst and bacterial destruction during CEACAM3-mediated phagocytosis. *The Journal of biological chemistry* 286, 9555-9566.
- Cambier, J.C. (1995). Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* 155, 3281-3285.
- Carvalho, F.A., Barnich, N., Sivignon, A., Darcha, C., Chan, C.H., Stanners, C.P., and Darfeuille-Michaud, A. (2009). Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *The Journal of experimental medicine* 206, 2179-2189.

- Castaldo, G., Tomaiuolo, R., Sanduzzi, A., Bocchino, M.L., Ponticiello, A., Barra, E., Vitale, D., Bariffi, F., Sacchetti, L., and Salvatore, F. (1997). Lung cancer metastatic cells detected in blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and dot-blot analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 15, 3388-3393.
- Chan, A.C., van Oers, N.S., Tran, A., Turka, L., Law, C.L., Ryan, J.C., Clark, E.A., and Weiss, A. (1994). Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J Immunol* 152, 4758-4766.
- Chen, D., Iijima, H., Nagaishi, T., Nakajima, A., Russell, S., Raychowdhury, R., Morales, V., Rudd, C.E., Utku, N., and Blumberg, R.S. (2004). Carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 isoforms alternatively inhibit and costimulate human T cell function. *J Immunol* 172, 3535-3543.
- Chen, T., and Gotschlich, E.C. (1996). CGM1a antigen of neutrophils, a receptor of gonococcal opacity proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14851-14856.
- Chen, T., Grunert, F., Medina-Marino, A., and Gotschlich, E.C. (1997). Several carcinoembryonic antigens (CD66) serve as receptors for gonococcal opacity proteins. *The Journal of experimental medicine* 185, 1557-1564.
- Chevinsky, A.H. (1991). CEA in tumors of other than colorectal origin. *Seminars in surgical oncology* 7, 162-166.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162, 156-159.
- Chu, D.H., van Oers, N.S., Malissen, M., Harris, J., Elder, M., and Weiss, A. (1999). Pre-T cell receptor signals are responsible for the down-regulation of Syk protein tyrosine kinase expression. *J Immunol* 163, 2610-2620.
- Coligan, J.E., Lautenschleger, J.T., Egan, M.L., and Todd, C.W. (1972). Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen. *Immunochemistry* 9, 377-386.
- Compare, D., Rocco, A., and Nardone, G. (2010). Risk factors in gastric cancer. *European review for medical and pharmacological sciences* 14, 302-308.
- Coopman, P.J., Do, M.T., Barth, M., Bowden, E.T., Hayes, A.J., Basyuk, E., Blancato, J.K., Vezza, P.R., McLeskey, S.W., Mangeat, P.H., *et al.* (2000). The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 406, 742-747.
- DeAngelis, A.M., Heinrich, G., Dai, T., Bowman, T.A., Patel, P.R., Lee, S.J., Hong, E.G., Jung, D.Y., Assmann, A., Kulkarni, R.N., *et al.* (2008). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1: a link between insulin and lipid metabolism. *Diabetes* 57, 2296-2303.
- Dicken, B.J., Bigam, D.L., Cass, C., Mackey, J.R., Joy, A.A., and Hamilton, S.M. (2005). Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Annals of surgery* 241, 27-39.
- Duxbury, M.S., Ito, H., Benoit, E., Ashley, S.W., and Whang, E.E. (2004). CEACAM6 is a determinant of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness. *British journal of cancer* 91, 1384-1390.

- Eastwood, G.L. (1995). A review of gastrointestinal epithelial renewal and its relevance to the development of adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Journal of clinical gastroenterology* 21 Suppl 1, S1-11.
- Ebrahimnejad, A., Streichert, T., Nollau, P., Horst, A.K., Wagener, C., Bamberger, A.M., and Brummer, J. (2004). CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells. *The American journal of pathology* 165, 1781-1787.
- Ergun, S., Kilik, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P., Gotze, J., Wurmbach, J.H., Horst, A., Weil, J., Fernando, M., *et al.* (2000). CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Molecular cell* 5, 311-320.
- Estrera, V.T., Chen, D.T., Luo, W., Hixson, D.C., and Lin, S.H. (2001). Signal transduction by the CEACAM1 tumor suppressor. Phosphorylation of serine 503 is required for growth-inhibitory activity. *The Journal of biological chemistry* 276, 15547-15553.
- Fodor, S., Jakus, Z., and Mocsai, A. (2006). ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response. *Immunology letters* 104, 29-37.
- Fournes, B., Sadekova, S., Turbide, C., Letourneau, S., and Beauchemin, N. (2001). The CEACAM1-L Ser503 residue is crucial for inhibition of colon cancer cell tumorigenicity. *Oncogene* 20, 219-230.
- Frangsmyr, L., Baranov, V., and Hammarstrom, S. (1999). Four carcinoembryonic antigen subfamily members, CEA, NCA, BGP and CGM2, selectively expressed in the normal human colonic epithelium, are integral components of the fuzzy coat. *Tumour Biol* 20, 277-292.
- Frisch, S.M., Vuori, K., Kelaita, D., and Sicks, S. (1996). A role for Jun-N-terminal kinase in anoikis; suppression by bcl-2 and crmA. *The Journal of cell biology* 135, 1377-1382.
- Fruehling, S., and Longnecker, R. (1997). The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *Virology* 235, 241-251.
- Gasche, J.A., Hoffmann, J., Boland, C.R., and Goel, A. (2011). Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 129, 1053-1063.
- Giles, R.H., van Es, J.H., and Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1653, 1-24.
- Gold, P., and Freedman, S.O. (1965). Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *The Journal of experimental medicine* 122, 467-481.
- Goldberg, L.H., and Mamelak, A.J. (2010). Review of actinic keratosis. Part I: etiology, epidemiology and clinical presentation. *Journal of drugs in dermatology : JDD* 9, 1125-1132.
- Goldstein, M.J., and Mitchell, E.P. (2005). Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest* 23, 338-351.
- Gooding, J.M., Yap, K.L., and Ikura, M. (2004). The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional

structures. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26, 497-511.

Grande, S.M., Katz, E., Crowley, J.E., Bernardini, M.S., Ross, S.R., and Monroe, J.G. (2006a). Cellular ITAM-containing proteins are oncoproteins in nonhematopoietic cells. *Oncogene* 25, 2748-2757.

Grande, S.M., Ross, S.R., and Monroe, J.G. (2006b). Viral immunoreceptor-associated tyrosine-based activation motifs: potential players in oncogenesis. *Future Oncol* 2, 301-310.

Gray-Owen, S.D. (2003). Neisserial Opa proteins: impact on colonization, dissemination and immunity. *Scand J Infect Dis* 35, 614-618.

Greicius, G., Severinson, E., Beauchemin, N., Obrink, B., and Singer, B.B. (2003). CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *J Leukoc Biol* 74, 126-134.

Gross, S.R. (2013). Actin binding proteins: Their ups and downs in metastatic life. *Cell adhesion & migration* 7, 199-213.

Haks, M.C., Cordaro, T.A., van den Brakel, J.H., Haanen, J.B., de Vries, E.F., Borst, J., Krimpenfort, P., and Kruisbeek, A.M. (2001). A redundant role of the CD3 gamma-immunoreceptor tyrosine-based activation motif in mature T cell function. *J Immunol* 166, 2576-2588.

Hammarstrom, S. (1999). The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 9, 67-81.

Hauck, C.R., and Meyer, T.F. (2003). 'Small' talk: Opa proteins as mediators of Neisseria-host-cell communication. *Curr Opin Microbiol* 6, 43-49.

Heckman, K.L., and Pease, L.R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* 2, 924-932.

Hefta, S.A., Hefta, L.J., Lee, T.D., Paxton, R.J., and Shively, J.E. (1988). Carcinoembryonic antigen is anchored to membranes by covalent attachment to a glycosylphosphatidylinositol moiety: identification of the ethanolamine linkage site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 4648-4652.

Hill, D.J., Toleman, M.A., Evans, D.J., Villullas, S., Van Alphen, L., and Virji, M. (2001). The variable P5 proteins of typeable and non-typeable *Haemophilus influenzae* target human CEACAM1. *Mol Microbiol* 39, 850-862.

Hill, D.J., and Virji, M. (2003). A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. *Mol Microbiol* 48, 117-129.

Holt, M.R., and Koffer, A. (2001). Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions. *Trends in cell biology* 11, 38-46.

Hombach, A., Koch, D., Sircar, R., Heuser, C., Diehl, V., Kruis, W., Pohl, C., and Abken, H. (1999). A chimeric receptor that selectively targets membrane-bound carcinoembryonic antigen (mCEA) in the presence of soluble CEA. *Gene therapy* 6, 300-304.

- Hostetter, R.B., Campbell, D.E., Chi, K.F., Kerckhoff, S., Cleary, K.R., Ullrich, S., Thomas, P., and Jessup, J.M. (1990). Carcinoembryonic antigen enhances metastatic potential of human colorectal carcinoma. *Arch Surg* 125, 300-304.
- Ilantzis, C., DeMarte, L., Screaton, R.A., and Stanners, C.P. (2002). Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia* 4, 151-163.
- Indik, Z.K., Park, J.G., Hunter, S., and Schreiber, A.D. (1995). The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 86, 4389-4399.
- Ino, Y., Gotoh, M., Sakamoto, M., Tsukagoshi, K., and Hirohashi, S. (2002). Dysadherin, a cancer-associated cell membrane glycoprotein, down-regulates E-cadherin and promotes metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 365-370.
- Jiang, A., Craxton, A., Kurosaki, T., and Clark, E.A. (1998). Different protein tyrosine kinases are required for B cell antigen receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase 1, and p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of experimental medicine* 188, 1297-1306.
- Kammerer, R., Hahn, S., Singer, B.B., Luo, J.S., and von Kleist, S. (1998). Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *European journal of immunology* 28, 3664-3674.
- Kammerer, R., Ruttiger, L., Riesenberger, R., Schauble, C., Krupar, R., Kamp, A., Sunami, K., Eisenried, A., Hennenberg, M., Grunert, F., *et al.* (2012). Loss of mammal-specific tectorial membrane component carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 16 (CEACAM16) leads to hearing impairment at low and high frequencies. *The Journal of biological chemistry* 287, 21584-21598.
- Kammerer, R., and Zimmermann, W. (2010). Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen families. *BMC biology* 8, 12.
- Kaneko-Kawano, T., Takasu, F., Naoki, H., Sakumura, Y., Ishii, S., Ueba, T., Eiyama, A., Okada, A., Kawano, Y., and Suzuki, K. (2012). Dynamic regulation of myosin light chain phosphorylation by Rho-kinase. *PloS one* 7, e39269.
- Katz, E., Lareef, M.H., Rassa, J.C., Grande, S.M., King, L.B., Russo, J., Ross, S.R., and Monroe, J.G. (2005). MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial cells in three-dimensional culture. *The Journal of experimental medicine* 201, 431-439.
- Kinugasa, T., Kuroki, M., Takeo, H., Matsuo, Y., Ohshima, K., Yamashita, Y., Shirakusa, T., and Matsuoka, Y. (1998). Expression of four CEA family antigens (CEA, NCA, BGP and CGM2) in normal and cancerous gastric epithelial cells: up-regulation of BGP and CGM2 in carcinomas. *International journal of cancer Journal international du cancer* 76, 148-153.
- Kleinerman, D.I., Dinney, C.P., Zhang, W.W., Lin, S.H., Van, N.T., and Hsieh, J.T. (1996). Suppression of human bladder cancer growth by increased expression of C-CAM1 gene in an orthotopic model. *Cancer research* 56, 3431-3435.
- Komorowski, S., Baranowska, B., and Maleszewski, M. (2006). CD9 protein appears on growing mouse oocytes at the time when they develop the ability to fuse with spermatozoa. *Zygote* 14, 119-123.

- Kovacs, E.M., Verma, S., Ali, R.G., Ratheesh, A., Hamilton, N.A., Akhmanova, A., and Yap, A.S. (2011). N-WASP regulates the epithelial junctional actin cytoskeleton through a non-canonical post-nucleation pathway. *Nature cell biology* 13, 934-943.
- Kuespert, K., Pils, S., and Hauck, C.R. (2006). CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Current opinion in cell biology* 18, 565-571.
- Kuespert, K., Weibel, S., and Hauck, C.R. (2007). Profiling of bacterial adhesin--host receptor recognition by soluble immunoglobulin superfamily domains. *J Microbiol Methods* 68, 478-485.
- Kuroki, M., Abe, H., Imakiirei, T., Liao, S., Uchida, H., Yamauchi, Y., and Oikawa, S. (2001). Identification and comparison of residues critical for cell-adhesion activities of two neutrophil CD66 antigens, CEACAM6 and CEACAM8. *J Leukoc Biol* 70, 543-550.
- Kuroki, M., Matsushita, H., Matsumoto, H., Hirose, Y., Senba, T., and Yamamoto, T. (1999). Nonspecific cross-reacting antigen-50/90 (NCA-50/90) as a new tumor marker. *Anticancer research* 19, 5599-5606.
- Kuroki, M., Yamanaka, T., Matsuo, Y., Oikawa, S., Nakazato, H., and Matsuoka, Y. (1995). Immunochemical analysis of carcinoembryonic antigen (CEA)-related antigens differentially localized in intracellular granules of human neutrophils. *Immunol Invest* 24, 829-843.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M., and Boucheix, C. (2000). Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 287, 319-321.
- Lee, B.S., Lee, S.H., Feng, P., Chang, H., Cho, N.H., and Jung, J.U. (2005). Characterization of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 signalosome. *Journal of virology* 79, 12173-12184.
- Lee, S.J., Heinrich, G., Fedorova, L., Al-Share, Q.Y., Ledford, K.J., Fernstrom, M.A., McInerney, M.F., Erickson, S.K., Gatto-Weis, C., and Najjar, S.M. (2008). Development of nonalcoholic steatohepatitis in insulin-resistant liver-specific S503A carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 mutant mice. *Gastroenterology* 135, 2084-2095.
- Leonard, D., Ajuh, P., Lamond, A.I., and Legerski, R.J. (2003). hLodestar/HuF2 interacts with CDC5L and is involved in pre-mRNA splicing. *Biochemical and biophysical research communications* 308, 793-801.
- Leung, N., Turbide, C., Balachandra, B., Marcus, V., and Beauchemin, N. (2008). Intestinal tumor progression is promoted by decreased apoptosis and dysregulated Wnt signaling in Ceacam1^{-/-} mice. *Oncogene* 27, 4943-4953.
- Levy, S., and Shoham, T. (2005). The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nature reviews Immunology* 5, 136-148.
- Lewis-Wambi, J.S., Cunliffe, H.E., Kim, H.R., Willis, A.L., and Jordan, V.C. (2008). Overexpression of CEACAM6 promotes migration and invasion of oestrogen-deprived breast cancer cells. *Eur J Cancer* 44, 1770-1779.
- Li Calzi, S., Choice, C.V., and Najjar, S.M. (1997). Differential effect of pp120 on insulin endocytosis by two variant insulin receptor isoforms. *The American journal of physiology* 273, E801-808.

- Li, Y.H., Hou, Y., Ma, W., Yuan, J.X., Zhang, D., Sun, Q.Y., and Wang, W.H. (2004). Localization of CD9 in pig oocytes and its effects on sperm-egg interaction. *Reproduction* 127, 151-157.
- Liu, W., Wei, W., Winer, D., Bamberger, A.M., Bamberger, C., Wagener, C., Ezzat, S., and Asa, S.L. (2007). CEACAM1 impedes thyroid cancer growth but promotes invasiveness: a putative mechanism for early metastases. *Oncogene* 26, 2747-2758.
- Luangdilok, S., Box, C., Patterson, L., Court, W., Harrington, K., Pitkin, L., Rhys-Evans, P., P, O.c., and Eccles, S. (2007). Syk tyrosine kinase is linked to cell motility and progression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer research* 67, 7907-7916.
- Luo, W., Tapolsky, M., Earley, K., Wood, C.G., Wilson, D.R., Logothetis, C.J., and Lin, S.H. (1999). Tumor-suppressive activity of CD66a in prostate cancer. *Cancer gene therapy* 6, 313-321.
- Luo, W., Wood, C.G., Earley, K., Hung, M.C., and Lin, S.H. (1997). Suppression of tumorigenicity of breast cancer cells by an epithelial cell adhesion molecule (CEACAM1): the adhesion and growth suppression are mediated by different domains. *Oncogene* 14, 1697-1704.
- Madsen, P., Rasmussen, H.H., Flint, T., Gromov, P., Kruse, T.A., Honore, B., Vorum, H., and Celis, J.E. (1995). Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7. *The Journal of biological chemistry* 270, 5823-5829.
- Markel, G., Lieberman, N., Katz, G., Arnon, T.I., Lotem, M., Drize, O., Blumberg, R.S., Bar-Haim, E., Mader, R., Eisenbach, L., *et al.* (2002). CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J Immunol* 168, 2803-2810.
- Markel, G., Ortenberg, R., Seidman, R., Sapoznik, S., Koren-Morag, N., Besser, M.J., Bar, J., Shapira, R., Kubi, A., Nardini, G., *et al.* (2009). Systemic dysregulation of CEACAM1 in melanoma patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*.
- Marone, R., Hess, D., Dankort, D., Muller, W.J., Hynes, N.E., and Badache, A. (2004). Memo mediates ErbB2-driven cell motility. *Nature cell biology* 6, 515-522.
- Masson, G.M., Anthony, F., and Wilson, M.S. (1983). Value of Schwangerschaftsprotein 1 (SP1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in the clinical management of threatened abortion. *British journal of obstetrics and gynaecology* 90, 146-149.
- Masuyer, G., Jabeen, T., Oberg, C.T., Leffler, H., Nilsson, U.J., and Acharya, K.R. (2012). Inhibition mechanism of human galectin-7 by a novel galactose-benzylphosphate inhibitor. *The FEBS journal* 279, 193-202.
- McCuaig, K., Turbide, C., and Beauchemin, N. (1992). mmCGM1a: a mouse carcinoembryonic antigen gene family member, generated by alternative splicing, functions as an adhesion molecule. *Cell Growth Differ* 3, 165-174.
- McLellan, A.S., Fischer, B., Dveksler, G., Hori, T., Wynne, F., Ball, M., Okumura, K., Moore, T., and Zimmermann, W. (2005). Structure and evolution of the mouse pregnancy-specific glycoprotein (Psg) gene locus. *BMC Genomics* 6, 4.
- Merchant, M., Caldwell, R.G., and Longnecker, R. (2000). The LMP2A ITAM is essential for providing B cells with development and survival signals in vivo. *Journal of virology* 74, 9115-9124.

- Mocsai, A., Abram, C.L., Jakus, Z., Hu, Y., Lanier, L.L., and Lowell, C.A. (2006). Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nature immunology* 7, 1326-1333.
- Monroe, J.G. (2004). Ligand-independent tonic signaling in B-cell receptor function. *Current opinion in immunology* 16, 288-295.
- Monroe, J.G. (2006). ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nature reviews Immunology* 6, 283-294.
- Morrison, J.A., and Raab-Traub, N. (2005). Roles of the ITAM and PY motifs of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A in the inhibition of epithelial cell differentiation and activation of {beta}-catenin signaling. *Journal of virology* 79, 2375-2382.
- Mueller, O., Hahnenberger, K., Dittmann, M., Yee, H., Dubrow, R., Nagle, R., and Ilsley, D. (2000). A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis* 21, 128-134.
- Muenzner, P., Bachmann, V., Zimmermann, W., Hentschel, J., and Hauck, C.R. (2010). Human-restricted bacterial pathogens block shedding of epithelial cells by stimulating integrin activation. *Science* 329, 1197-1201.
- Muenzner, P., Rohde, M., Kneitz, S., and Hauck, C.R. (2005). CEACAM engagement by human pathogens enhances cell adhesion and counteracts bacteria-induced detachment of epithelial cells. *The Journal of cell biology* 170, 825-836.
- Nagel, G., Grunert, F., Kuipers, T.W., Watt, S.M., Thompson, J., and Zimmermann, W. (1993). Genomic organization, splice variants and expression of CGM1, a CD66-related member of the carcinoembryonic antigen gene family. *European journal of biochemistry / FEBS* 214, 27-35.
- Najjar, S.M. (2002). Regulation of insulin action by CEACAM1. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 13, 240-245.
- Nam, J.S., Kang, M.J., Suchar, A.M., Shimamura, T., Kohn, E.A., Michalowska, A.M., Jordan, V.C., Hirohashi, S., and Wakefield, L.M. (2006). Chemokine (C-C motif) ligand 2 mediates the prometastatic effect of dysadherin in human breast cancer cells. *Cancer research* 66, 7176-7184.
- Neumaier, M., Paululat, S., Chan, A., Matthaes, P., and Wagener, C. (1993). Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 10744-10748.
- Niir, H., and Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nature reviews Immunology* 2, 945-956.
- Nioche, P., Liu, W.Q., Broutin, I., Charbonnier, F., Latreille, M.T., Vidal, M., Roques, B., Garbay, C., and Ducruix, A. (2002). Crystal structures of the SH2 domain of Grb2: highlight on the binding of a new high-affinity inhibitor. *Journal of molecular biology* 315, 1167-1177.
- Obrink, B. (1997). CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Current opinion in cell biology* 9, 616-626.
- Olsen, A., Teglund, S., Nelson, D., Gordon, L., Copeland, A., Georgescu, A., Carrano, A., and Hammarstrom, S. (1994). Gene organization of the pregnancy-

specific glycoprotein region on human chromosome 19: assembly and analysis of a 700-kb cosmid contig spanning the region. *Genomics* 23, 659-668.

Ordóñez, C., Screaton, R.A., Ilantzis, C., and Stanners, C.P. (2000). Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer research* 60, 3419-3424.

Ordóñez, C., Zhai, A.B., Camacho-Leal, P., Demarte, L., Fan, M.M., and Stanners, C.P. (2007). GPI-anchored CEA family glycoproteins CEA and CEACAM6 mediate their biological effects through enhanced integrin $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectin interaction. *Journal of cellular physiology* 210, 757-765.

Osman, N., Lucas, S.C., Turner, H., and Cantrell, D. (1995). A comparison of the interaction of Shc and the tyrosine kinase ZAP-70 with the T cell antigen receptor zeta chain tyrosine-based activation motif. *The Journal of biological chemistry* 270, 13981-13986.

Pan, H., O'Brien M, J., Wigglesworth, K., Eppig, J.J., and Schultz, R.M. (2005). Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development in vitro. *Developmental biology* 286, 493-506.

Pao, L.I., Famiglietti, S.J., and Cambier, J.C. (1998). Asymmetrical phosphorylation and function of immunoreceptor tyrosine-based activation motif tyrosines in B cell antigen receptor signal transduction. *J Immunol* 160, 3305-3314.

Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., and Riley, J.L. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and cellular biology* 25, 9543-9553.

Paxton, R.J., Mooser, G., Pande, H., Lee, T.D., and Shively, J.E. (1987). Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 920-924.

Pils, S., Gerrard, D.T., Meyer, A., and Hauck, C.R. (2008). CEACAM3: an innate immune receptor directed against human-restricted bacterial pathogens. *International journal of medical microbiology : IJMM* 298, 553-560.

Popp, A., Dehio, C., Grunert, F., Meyer, T.F., and Gray-Owen, S.D. (1999). Molecular analysis of neisserial Opa protein interactions with the CEA family of receptors: identification of determinants contributing to the differential specificities of binding. *Cellular microbiology* 1, 169-181.

Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H.D., Drzeniek, Z., Helmchen, U., Loning, T., and Wagener, C. (1996). CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 44, 35-41.

Qu, S., Long, J., Cai, Q., Shu, X.O., Cai, H., Gao, Y.T., and Zheng, W. (2008). Genetic polymorphisms of metastasis suppressor gene NME1 and breast cancer survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 4787-4793.

Renfranz, P.J., and Beckerle, M.C. (2002). Doing (F/L)PPPPs: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration. *Current opinion in cell biology* 14, 88-103.

- Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383-384.
- Roose, J.P., Diehn, M., Tomlinson, M.G., Lin, J., Alizadeh, A.A., Botstein, D., Brown, P.O., and Weiss, A. (2003). T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. *PLoS biology* 1, E53.
- Ross, S.R., Schmidt, J.W., Katz, E., Cappelli, L., Hultine, S., Gimotty, P., and Monroe, J.G. (2006). An immunoreceptor tyrosine activation motif in the mouse mammary tumor virus envelope protein plays a role in virus-induced mammary tumors. *Journal of virology* 80, 9000-9008.
- Rudert, F., Zimmermann, W., and Thompson, J.A. (1989). Intra- and interspecies analyses of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family reveal independent evolution in primates and rodents. *J Mol Evol* 29, 126-134.
- Sadekova, S., Lamarche-Vane, N., Li, X., and Beauchemin, N. (2000). The CEACAM1-L glycoprotein associates with the actin cytoskeleton and localizes to cell-cell contact through activation of Rho-like GTPases. *Molecular biology of the cell* 11, 65-77.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Sarantis, H., and Gray-Owen, S.D. (2012). Defining the Roles of Human Carcinoembryonic Antigen-Related Cellular Adhesion Molecules during Neutrophil Responses to *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection and immunity* 80, 345-358.
- Schmitter, T., Agerer, F., Peterson, L., Munzner, P., and Hauck, C.R. (2004). Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens. *The Journal of experimental medicine* 199, 35-46.
- Schmitter, T., Pils, S., Sakk, V., Frank, R., Fischer, K.D., and Hauck, C.R. (2007a). The granulocyte receptor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3 (CEACAM3) directly associates with Vav to promote phagocytosis of human pathogens. *J Immunol* 178, 3797-3805.
- Schmitter, T., Pils, S., Weibel, S., Agerer, F., Peterson, L., Buntru, A., Kopp, K., and Hauck, C.R. (2007b). Opa proteins of pathogenic neisseriae initiate Src kinase-dependent or lipid raft-mediated uptake via distinct human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule isoforms. *Infection and immunity* 75, 4116-4126.
- Scholz, S., Zimmermann, W., Schwarzkopf, G., Grunert, F., Rogaczewski, B., and Thompson, J. (2000). Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *The American journal of pathology* 156, 595-605.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7, 3.
- Screaton, R.A., DeMarte, L., Draber, P., and Stanners, C.P. (2000). The specificity for the differentiation blocking activity of carcinoembryonic antigen resides in its glycoposphatidyl-inositol anchor. *The Journal of cell biology* 150, 613-626.

- Shao, L., Allez, M., Park, M.S., and Mayer, L. (2006). Immunomodulatory roles of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1072, 194-209.
- Shirasu, N., Shibaguci, H., Kuroki, M., and Yamada, H. (2010). Construction and molecular characterization of human chimeric T-cell antigen receptors specific for carcinoembryonic antigen. *Anticancer research* 30, 2731-2738.
- Shively, J.E. (2004). CEACAM1 and hyperplastic polyps: new links in the chain of events leading to colon cancer. *Oncogene* 23, 9303-9305.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5522-5527.
- Sikorska, H., Shuster, J., and Gold, P. (1988). Clinical applications of carcinoembryonic antigen. *Cancer Detect Prev* 12, 321-355.
- Silver, R.M., Heyborne, K.D., and Leslie, K.K. (1993). Pregnancy specific beta 1 glycoprotein (SP-1) in maternal serum and amniotic fluid; pre-eclampsia, small for gestational age fetus and fetal distress. *Placenta* 14, 583-589.
- Simpson, C.D., Anyiwe, K., and Schimmer, A.D. (2008). Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer letters* 272, 177-185.
- Skolnik, E.Y., Lee, C.H., Batzer, A., Vicentini, L.M., Zhou, M., Daly, R., Myers, M.J., Jr., Backer, J.M., Ullrich, A., White, M.F., *et al.* (1993). The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *The EMBO journal* 12, 1929-1936.
- Snyder, S.K., Wessner, D.H., Wessells, J.L., Waterhouse, R.M., Wahl, L.M., Zimmermann, W., and Dveksler, G.S. (2001). Pregnancy-specific glycoproteins function as immunomodulators by inducing secretion of IL-10, IL-6 and TGF-beta1 by human monocytes. *Am J Reprod Immunol* 45, 205-216.
- Stein, R., and Goldenberg, D.M. (2004). A humanized monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen, labetuzumab, inhibits tumor growth and sensitizes human medullary thyroid cancer xenografts to dacarbazine chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 3, 1559-1564.
- Stern, N., Markel, G., Arnon, T.I., Gruda, R., Wong, H., Gray-Owen, S.D., and Mandelboim, O. (2005). Carcinoembryonic antigen (CEA) inhibits NK killing via interaction with CEA-related cell adhesion molecule 1. *J Immunol* 174, 6692-6701.
- Su, A.I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K.A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., *et al.* (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6062-6067.
- Subramanian, A., and Miller, D.M. (2000). Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *The Journal of biological chemistry* 275, 5958-5965.
- Symons, M., Derry, J.M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., and Abo, A. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84, 723-734.

- Teglund, S., Zhou, G.Q., and Hammarstrom, S. (1995). Characterization of cDNA encoding novel pregnancy-specific glycoprotein variants. *Biochemical and biophysical research communications* 211, 656-664.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.
- Thompson, J., and Zimmermann, W. (1988). The carcinoembryonic antigen gene family: structure, expression and evolution. *Tumour Biol* 9, 63-83.
- Thompson, J., Zimmermann, W., Nollau, P., Neumaier, M., Weber-Arden, J., Schrewe, H., Craig, I., and Willcocks, T. (1994). CGM2, a member of the carcinoembryonic antigen gene family is down-regulated in colorectal carcinomas. *The Journal of biological chemistry* 269, 32924-32931.
- Thompson, J.A., Grunert, F., and Zimmermann, W. (1991). Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 5, 344-366.
- Thomson, D.M., Krupey, J., Freedman, S.O., and Gold, P. (1969). The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 64, 161-167.
- Tomlinson, C.C., and Damania, B. (2004). The K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activates the Akt signaling pathway. *Journal of virology* 78, 1918-1927.
- Tsukada, M., Wakai, T., Matsuda, Y., Korita, P.V., Shirai, Y., Ajioka, Y., Hatakeyama, K., and Kubota, M. (2009). Loss of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression predicts metachronous pulmonary metastasis and poor survival in patients with hepatoblastoma. *Journal of pediatric surgery* 44, 1522-1528.
- Underhill, D.M., and Goodridge, H.S. (2007). The many faces of ITAMs. *Trends in immunology* 28, 66-73.
- Virji, M., Evans, D., Griffith, J., Hill, D., Serino, L., Hadfield, A., and Watt, S.M. (2000). Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* 36, 784-795.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J., and Watt, S.M. (1996). Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic neisseriae. *Mol Microbiol* 22, 941-950.
- Wanebo, H.J., Llaneras, M., Martin, T., and Kaiser, D. (1989). Prospective monitoring trial for carcinoma of colon and rectum after surgical resection. *Surgery, gynecology & obstetrics* 169, 479-487.
- Wang, H., Kadlecsek, T.A., Au-Yeung, B.B., Goodfellow, H.E., Hsu, L.Y., Freedman, T.S., and Weiss, A. (2010). ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a002279.
- Wang, J., Gray-Owen, S.D., Knorre, A., Meyer, T.F., and Dehio, C. (1998). Opa binding to cellular CD66 receptors mediates the transcellular traversal of *Neisseria gonorrhoeae* across polarized T84 epithelial cell monolayers. *Mol Microbiol* 30, 657-671.

- Wang, L., Dittmer, D.P., Tomlinson, C.C., Fakhari, F.D., and Damania, B. (2006). Immortalization of primary endothelial cells by the K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Cancer research* 66, 3658-3666.
- Wang, S., Ding, Y.B., Chen, G.Y., Xia, J.G., and Wu, Z.Y. (2004). Hypermethylation of Syk gene in promoter region associated with oncogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG* 10, 1815-1818.
- Waterhouse, R., Ha, C., and Dveksler, G.S. (2002). Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. *The Journal of experimental medicine* 195, 277-282.
- Waterman, P.M., and Cambier, J.C. (2010). The conundrum of inhibitory signaling by ITAM-containing immunoreceptors: potential molecular mechanisms. *FEBS letters* 584, 4878-4882.
- Watt, S.M., Teixeira, A.M., Zhou, G.Q., Doyonnas, R., Zhang, Y., Grunert, F., Blumberg, R.S., Kuroki, M., Skubitz, K.M., and Bates, P.A. (2001). Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. *Blood* 98, 1469-1479.
- Weaver, V.M., Lelievre, S., Lakins, J.N., Chrenek, M.A., Jones, J.C., Giancotti, F., Werb, Z., and Bissell, M.J. (2002). beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer cell* 2, 205-216.
- Weeds, A. (1982). Actin-binding proteins--regulators of cell architecture and motility. *Nature* 296, 811-816.
- Wessells, J., Wessner, D., Parsells, R., White, K., Finkenzeller, D., Zimmermann, W., and Dveksler, G. (2000). Pregnancy specific glycoprotein 18 induces IL-10 expression in murine macrophages. *European journal of immunology* 30, 1830-1840.
- Westwood, J.H., Bessell, E.M., Bukhari, M.A., Thomas, P., and Walker, J.M. (1974). Studies on the structure of the carcinoembryonic antigen. I. some deductions on the basis of chemical degradations. *Immunochemistry* 11, 811-818.
- Williams, A.F. (1998). Observed child restraint use in automobiles. 1976. *Inj Prev* 4, 155-160.
- Williams, A.F., and Barclay, A.N. (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annual review of immunology* 6, 381-405.
- Wirth, T., Soeth, E., Czubayko, F., and Juhl, H. (2002). Inhibition of endogenous carcinoembryonic antigen (CEA) increases the apoptotic rate of colon cancer cells and inhibits metastatic tumor growth. *Clinical & experimental metastasis* 19, 155-160.
- Wong, N.A., and Pignatelli, M. (2002). Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis? *The American journal of pathology* 160, 389-401.
- Wurz, H., Geiger, W., Kunzig, H.J., Jabs-Lehmann, A., Bohn, H., and Luben, G. (1981). Radioimmunoassay of SP1 (pregnancy-specific beta1-glycoprotein) in maternal blood and in amniotic fluid normal and pathologic pregnancies. *J Perinat Med* 9, 67-78.
- Yamashita, K., Totani, K., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Ueda, I., and Kobata, A. (1987). Structural studies of the carbohydrate moieties of carcinoembryonic antigens. *Cancer research* 47, 3451-3459.

- Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T., and Yamamura, H. (2001). Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochemical and biophysical research communications* 288, 495-498.
- Zebhauser, R., Kammerer, R., Eisenried, A., McLellan, A., Moore, T., and Zimmermann, W. (2005). Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine Cea family. *Genomics* 86, 566-580.
- Zeng, F., Baldwin, D.A., and Schultz, R.M. (2004). Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Developmental biology* 272, 483-496.
- Zhang, H., Eisenried, A., Zimmermann, W., and Shively, J.E. (2013). Role of CEACAM1 and CEACAM20 in an In Vitro Model of Prostate Morphogenesis. *PloS one* 8, e53359.
- Zhang, W., Gong, S., Huang, L., Liu, B., and Zhao, L. (2011). [Rapid genetic diagnosis of patients with non-syndromic sensorineural hearing loss]. *Lin chuang er bi yan hou tou jing wai ke za zhi* = Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery 25, 593-596.
- Zhao, L., Xu, S., Fjaertoft, G., Pauksen, K., Hakansson, L., and Venge, P. (2004). An enzyme-linked immunosorbent assay for human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8, a biological marker of granulocyte activities in vivo. *Journal of immunological methods* 293, 207-214.
- Zheng, J., Miller, K.K., Yang, T., Hildebrand, M.S., Shearer, A.E., DeLuca, A.P., Scheetz, T.E., Drummond, J., Scherer, S.E., Legan, P.K., *et al.* (2011). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with alpha-tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4218-4223.
- Zhou, C.J., Liu, B., Zhu, K.X., Zhang, Q.H., Zhang, T.G., Xu, W.H., Wang, H.B., Yu, W.H., Qu, Y.D., Wang, H.J., *et al.* (2009a). The different expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) and possible roles in gastric carcinomas. *Pathology, research and practice* 205, 483-489.
- Zhou, C.J., Qu, X., Yang, Y.M., Wang, F.F., Dong, Z.Q., Wang, C.Q., Zhang, X.Y., Liu, G.X., Wei, F.C., and Sun, S.Z. (2009b). CEACAM1 distribution and its effects on angiogenesis and lymphangiogenesis in oral carcinoma. *Oral oncology* 45, 883-886.
- Zhou, G.Q., Baranov, V., Zimmermann, W., Grunert, F., Erhard, B., Mincheva-Nilsson, L., Hammarstrom, S., and Thompson, J. (1997). Highly specific monoclonal antibody demonstrates that pregnancy-specific glycoprotein (PSG) is limited to syncytiotrophoblast in human early and term placenta. *Placenta* 18, 491-501.
- Zhou, H., Fuks, A., Alcaraz, G., Bolling, T.J., and Stanners, C.P. (1993). Homophilic adhesion between Ig superfamily carcinoembryonic antigen molecules involves double reciprocal bonds. *The Journal of cell biology* 122, 951-960.
- Zimmermann, M. (2010). Deliver us from evil: carer burden in Alzheimer's disease. *Med Humanit* 36, 101-107.
- Zimmermann, W., Weber, B., Ortlieb, B., Rudert, F., Schempp, W., Fiebig, H.H., Shively, J.E., von Kleist, S., and Thompson, J.A. (1988). Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors. *Cancer research* 48, 2550-2554.
- Zimmermann, W., Weiss, M., and Thompson, J.A. (1989). cDNA cloning demonstrates the expression of pregnancy-specific glycoprotein genes, a subgroup

of the carcinoembryonic antigen gene family, in fetal liver. Biochemical and biophysical research communications 163, 1197-1209.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABK	Ammonium Bikarbonat (NH_4HCO_3)
Ak	Antikörper
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C20	CEACAM20
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CEA	karzinoembryonales Antigen (<i>carcinoembryonic antigen</i>)
CEACAM	CEA-verwandtes Zelladhäsionsmolekül (<i>CEA-related cell-adhesion molecule</i>)
CELISA	<i>cell based enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
CMV	Cytomegalievirus
Cp	Crossing point
Cyt	zytoplasmatisch
dH ₂ O	destilliertes Wasser
(d)NTP	2'-(Desoxy)Ribonukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
F	Phenylalanin
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell scan</i>)
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
GFP	Green fluorescent protein
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
HHV	humanes Herpesvirus (<i>human herpes virus</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IAM	Iodacetamid
Ig	Immunglobulin
IgC-Domäne	konstante (<i>constant</i>) Immunglobulindomäne
IgV-Domäne	variable (<i>variable</i>) Immunglobulindomäne
IP	Immunpräzipitation
ITAM	auf der Aminosäure Tyrosin basierendes aktivierendes Motiv des Immunrezeptors (<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)
ITIM	auf der Aminosäure Tyrosin basierendes inhibitorisches Motiv des Immunrezeptors (<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LMP2A	Latentes Membranprotein 2A (<i>latent membrane protein 2A</i>)
M	molar
MEM	<i>minimal essential medium</i>
NEAA	<i>non-essential amino acids solution</i>
mM	millimolar
Mmu	Maus (<i>Mus musculus</i>)

mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
μM	mikromolar
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PSA	Prostata-spezifisches Antigen (<i>prostate specific antigen</i>)
PSG	Schwangerschaftsspezifisches Glykoprotein (<i>pregnancy specific glycoprotein</i>)
PTK	Proteintyrosinkinase
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Reverse Transkription (<i>reverse transcription</i>)
SYK	<i>spleen tyrosine kinase</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-Phosphin
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
Y	Tyrosin

9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herr Professor Zimmermann, der mir die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens beigebracht hat. Mit viel Engagement und seiner stets vorhandener Diskussionsbereitschaft hat er meine Doktorarbeit merklich vorangetrieben. Zudem ermöglichte er mir einen wundervollen vierwöchigen Forschungsaufenthalt in Los Angeles. Herzlichen Dank dafür.

Ich möchte mich besonders bei Herr Dr. Riesenberg für die Einarbeitung in verschiedensten Methoden und für die vielen wertvollen Hinweise bedanken. Auch möchte ich mich bei Frau Baumberger für die hingebungsvolle Einführung in die Methode des FACS bedanken.

Tausend Dank an Frau Stadlbauer für die aufwendige Herstellung der weiteren stabilen Transfektanten. Herrn Dr. Buchner, Herrn Palluch, Herrn PD Dr. Kammerer und Frau Dr. Pohla danke ich die freundliche Arbeitsatmosphäre und tatkräftige organisatorische Unterstützung, insbesondere Herrn Palluch verdanke ich die Qualitätsmessungen.

Bei Herrn Dr. Herbst möchte ich mich für die Bereitstellung des pRTS-Vektors und die Tips im Umgang mit diesem bedanken. Vielen Dank an Frau Dr. Ebelt für das Magenkarzinomgewebe. Herrn Dr. Weiler verdanke ich die Gewebeschnitte.

Bei meiner Mitdoktorantin Annegret Kamp möchte ich mich für die hervorragende Stimmung und den immer vorhandenen Schokoladenvorrat bedanken. Auch den beiden Doktorantinnen Laura Szymanski und Elena Vetter danke ich für die vielen unterhaltsamen Gespräche.

Außerordentlicher Dank gilt auch Herrn Professor John Shively, der meinen vierwöchigen Forschungsaufenthalt in Los Angeles betreut hat. Er und seine lebenswürdige Frau Louise haben mich in ihrem Haus aufgenommen. Vielen Dank für die Ausflüge, das tägliche gemeinsame Abendessen und die Einführung in die Regeln des Baseballs. Mein besonderer Dank gilt auch seiner Doktorandin Hui Zhang, die mit mir zusammen das arbeitsintensive Experiment der Massenspektrometrie durchführte.

Meinen Eltern danke ich für ihre kontinuierliche Unterstützung.

In besonderem Maße möchte ich auch Benjamin Welte für seine fortwährende Begleitung und die aufbauenden Worte, ohne dich wäre das Vorankommen in dieser Form nicht möglich gewesen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Funktionelle Analyse von CEACAM20, einem epithelialen Rezeptor mit
antiadhäsiven Eigenschaften“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen
sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der
Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder
in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen
Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Carina Hoffmann